

# 生物化学

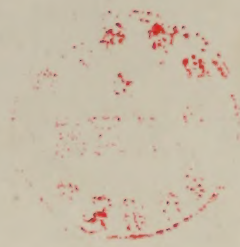
细胞结构和功能的分子基础

册

[美] A. L. 伦宁格 著

科学出版社

71  
- 710





58.17  
490

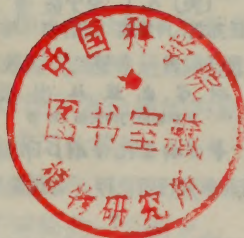
# 生 物 化 学

## 细胞结构和功能的分子基础

上 册

[美] A. L. 伦宁格 著

任邦哲 卢惠霖 周衍椒 等译



科 学 出 版 社

1981

22852

中科院植物所图书馆



S0014711

## 内 容 简 介

本书介绍了生物化学中重要的基本知识和理论。着重阐述了细胞内能量转移的规律,各种主要代谢的调节机理,细胞各种超微结构在生命活动中的作用,蛋白质的生物合成,蛋白质分子空间构型与生物功能的关系,以及生物特征遗传的分子基础等,并反映了这些领域里的新进展。

全书共分四篇,三十七章。中译本分上下两册出版,上册包括第 I、II 两篇,共二十二章。可供大专院校生物系师生,生物化学、细胞生物学及医学工作者参考。

Albert L. Lehninger

BIOCHEMISTRY

*The Molecular Basis of Cell Structure and Function*

Worth Publishers Inc., 2nd ed., 1975

## 生 物 化 学

细胞结构和功能的分子基础

上 册

[美] A. L. 伦宁格 著

任邦哲 卢惠霖 周衍椒 等译

责任编辑 姜梦兰 吴铁双

科学出版社出版

北京朝阳门内大街 137 号

中国科学院印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

※

1981 年 12 月第 一 版 开本: 787×1092 1/16

1981 年 12 月第一次印刷 印张: 35

印数: 0001—7,050 字数: 800,000

统一书号: 13031·1702

本社书号: 2326·13—10

定价: 5.35 元



## 第二版前言

很早就有人说过,要对自己的工作感到愉快,一个人必须适合做此项工作,对它有成功的信心,而且不要为它工作过多。为了急于完成第二版,常有过多的工作需要做,但是,即令是在情绪最低的时候,我的精神也总是由于用过第一版的学生们写来的成百封热情洋溢的信件而受到鼓舞。

我真想把这第二版称作一本全新的教科书;因为几乎每一段都重新写过,而且增加了许多内容。但是我保持了学生们和教师们在第一轮里认为有益的结构和体裁。我也试图把中心放在主要的生化概念和这一鼓舞人心的领域里新发现所产生的影响上面,而不是面面俱到地去考虑细节。

我仍坚信研究生物化学最好是从一套有组织的原则着手而不是从零散的事实与假说着手进行探索。生物化学有它的结构,有一组形成一体的主题,深受遗传控制对蛋白质形状与功能的奇妙的影响支配。这种样式的有组织的原则和它们的含义,其令人信服之处我在称之为“活机体的分子逻辑”的绪论中作了陈述。和第一版一样,本书的其余部分是建立在这篇绪论的基础上。从生物分子的结构和性质开始,推向放出能量过程与需用能量过程的研究,然后以我们旅途的最高峰——遗传信息的复制、转录与翻译来结束。

本书现在的互见条目可以查考到页数而不止是章数。所有酶促反应都平衡了,代谢途径的例证基本上完全了,而且所有酶的名称都包括进去了(我使用的是酶学委员会1972年报告所推荐的酶的名称)。习题完全重新做过,并且比以前更多了。

由于第二版里其它新材料太多了,我只能在此处篇幅提一些最突出的。有更多的地方把生物化学知识应用于人类健康与疾病问题。有“激素作用的生物化学方面”与“哺乳类代谢中器官之间的相互关系”这两个和人类生化特别有关的新章。其中激素章涉及内分泌系统的组织,下丘脑与垂体的关系,以及激素受体和细胞内信使,如环状AMP的功能和其它内容。有关代谢整合的章节包括对以下各方面的叙述:每一器官的代谢特点及各器官之间的代谢相互作用,代谢率,血液对营养素和气体的运输,肾脏调节尿成分的功能,以及肝和脂肪组织在燃料供应的加工和分配中所起的特殊作用。我还增加了对饥饿与糖尿病的讨论,以表明人类机体在应付危难时是如何调整其代谢的。

在蛋白质和酶的领域中,我详细讨论了蛋白质的构象,蛋白质折叠与伸展的动力学和热力学,以及变构转换时序列的和全或无的模型。还有一个新章讨论蛋白质净化与显示特征的艺术和科学。有关酶的各章也用酶作用的机制和动力学的新资料加以充实,包括双底物反应。我还写了关于维生素和辅酶的一个新章。

本书第四篇是最彻底改写过的部分。关于DNA的那章包括了细菌和病毒基因组的结构新资料,以及包括重叠序列与倒重叠等在内的有关真核染色体的许多新知识。关于DNA复制与转录那一章也作了最新的修订,将近几年的重要新进展包括了进去。关于蛋白质合成和氨基酸密码各章也作了修订。由于细胞生物学这个重要领域有了重大进展,因此关于基因表现的调节这一章受到特别重视。关于形态发生与自我装配的资料,以及



生命起源的资料也都作了重大的修订。

总之，我发现第二版的写作对我自己也是一次生物化学的重新教育。我仅能希望自己也也许为别人稍稍铺平了一点道路。

许多章节经有关领域的专家检阅过，我对他们给予的指正和鼓励非常感激。和以前一样，我将极大的欢迎来自这本新书读者的批评。

Albert L. Lehninger

1975年5月

[任邦哲译]



## 第一版前言

本书是为那些第一次学习生物化学——也许是他们唯一的生化课程——的学生们写的，不论他们是大学本科生或是研究生还是医科学生。我做这项工作是因为要把我对这个学科近年变化的个人看法传授给学生。生物化学已经不再仅仅是许多有机化合物在生物中的存在和许多酶促反应的目录了。最近几年，随着许多新事实生化已经获得一套组织原则，这些原则使得生化成为一个简单得多而容易了解的领域，与此同时，也成为对生物学中许多重要问题进行分析的更有力的工具。

这是怎么发生的呢？科学研究的每一个领域总是在它发展的某个时候发生深刻的转变，通过少数几个基本概念把一群杂乱无章的事实和假说统一起来结晶成为一个合乎逻辑的模型。实验中的新发现和许多新的见解已经促使生物化学发生了这种转变。新发现和新见解之中有：对细胞内部能量转换原理的认识，主要代谢途径的调节机制；膜、核糖体和细胞的其它超微结构因素在细胞的分子活动中的重要性，以及氨基酸顺序决定蛋白质分子的三维空间构象因而也决定它们的生物功能这个意义深远的结论。关于遗传学的分子基础的新知识，改变了生物科学的一切，有着最深刻的影响。由于这些发展，生物化学现在有了主要的情节，有了主题旋律，就是我在绪论中试图用简单的词句加以表达的。

本书主要涉及细胞水平上的生物化学，在这水平上生物化学的有组织的原理是极为明确显然的。重点是放在那些主要概念上而不是面面俱到地讨论生化的细节。全书共分四大部分：

1. 生物分子
2. 放出能量的过程
3. 需要能量的过程
4. 遗传信息的传递

这四部分又再分成我认为是合乎逻辑进展的各章。每一章对于教师和学生都是一件容易处理的“包裹”，相当于一次讲授或讨论单元的内容。我赞同很多教师的意见，某些生物分子的结构和性质最好是和它们的代谢一道来教。采用此书时这种方式是完全可行的，然而为了方便学生起见我特意将有关各种类型生物分子的结构、化学和发生的材料收集在一节里。我相信这将便于参考，同时又允许使用中有灵活性。

生物化学今天有许多新尖端，在蛋白质合成的调节及其在细胞分化过程中的作用，自我装配与形态发生的分子基础，以及生命起源各章中，我试图概略叙述某些最有希望的领域，这些章可能很快就大大过时了，但希望它们将使学生们对未来的生物化学有所了解。

## 答 谢

许多人会认为一个作者独立写这么一本全面的生化教科书是一种蛮干，然而我的出版者使得本书有可能获得对所包括的领域研究和(或)教学的许多化学家、生物学家以及生物学家的批评和建议。每章都经过至少是一个而且常常是几个权威人士阅读和评论。



我深深感谢他们,不仅感谢他们善意的鼓励和往往是应得的尖锐的批评,也感谢那些只有真正的专家才能够表达出来的洞察力和远见。在事实、解释或着重点方面发现错误恐怕在所不免,这些错误自然咎全在我。我将同样极大地感谢从学生们和教师们那里收到的评论、批评、差错的通知,以及关于今后再印刷或新版时能加以改进的意见。

Albert L. Lehninger

Sparks, Maryland.

1973年3月

【任邦哲译 卢惠霖校】



# 目 录

绪论 活机体的分子逻辑 .....	1
鉴别生活物质的特征 .....	1
生物化学与生命状态 .....	1
生物分子 .....	2
活细胞中的能量转换 .....	4
活细胞中的化学反应 .....	5
细胞内反应的自我调节 .....	6
活机体的自我复制 .....	7

## 第 I 篇 细胞的分子组成

第一章 生物分子与细胞 .....	10
有机化合物的生物适宜性 .....	10
细胞的分子组织系统 .....	11
原始的生物分子 .....	14
生物分子的专门化与分化 .....	14
生物分子的起源 .....	16
生物分子的适宜性 .....	18
生物分子的大小和形状 .....	18
生物分子、超分子结构与细胞器 .....	21
细胞的结构组织 .....	28
摘要 .....	28
参考文献 .....	29
第二章 水 .....	30
水的物理性质及氢键结合 .....	30
液态水的结构 .....	32
氢键的其它性质 .....	32
水的溶媒性质 .....	33
疏水性相互作用 .....	34
溶质对水性质的影响 .....	35
水的电离作用 .....	36
水的离子积: pH 尺度 .....	37
pH 的测定 .....	39
酸和碱 .....	39



酸碱指示剂 .....	42
缓冲剂 .....	42
水环境对活机体的适宜性 .....	43
摘要 .....	44
参考文献 .....	44
习题 .....	45
<b>第三章 蛋白质及其生物学功能概述</b> .....	47
蛋白质的组成 .....	47
蛋白质分子的大小 .....	49
蛋白质的构象 .....	50
蛋白质的超分子装配 .....	51
变性 .....	52
蛋白质功能的多样性 .....	52
抗体与免疫反应; 蛋白质的物种特异性 .....	55
多肽链中顺序的异构现象 .....	57
蛋白质中氨基酸顺序的遗传密码 .....	57
突变 .....	58
摘要 .....	59
参考文献 .....	59
<b>第四章 蛋白质的结构单位——氨基酸</b> .....	60
蛋白质中常见的氨基酸 .....	60
蛋白质中少见的氨基酸 .....	63
非蛋白质氨基酸 .....	64
氨基酸的酸碱性质 .....	66
氨基酸的立体化学 .....	69
吸收光谱 .....	72
氨基酸的化学反应 .....	72
氨基酸混合物的分析 .....	76
摘要 .....	78
参考文献 .....	79
习题 .....	80
<b>第五章 蛋白质: 共价主链与氨基酸顺序</b> .....	82
肽类的结构 .....	82
非蛋白质来源的肽类 .....	82
肽的酸碱性质 .....	84
肽的光学性质 .....	84
肽的化学性质 .....	85
测定氨基酸顺序的步骤 .....	85
双硫键的断裂及多肽链的分离 .....	86



多肽链的完全水解与氨基酸组成的测定 .....	86
肽的 N-末端残基的鉴定 .....	88
肽的 C-末端残基的鉴定 .....	90
多肽链的部分水解 .....	91
肽的分离和分析 .....	92
肽片段的顺序分析 .....	93
肽段排列次序 .....	94
双硫交联键位置的确定 .....	94
酰胺位置的确定 .....	94
某些肽和蛋白质的氨基酸顺序 .....	94
同系蛋白质在顺序上的种属变化 .....	97
有关的蛋白质的进化 .....	99
基因复制 .....	100
同一种属内氨基酸顺序的突变 .....	100
多肽链的人工合成 .....	102
氨基酸同聚物 .....	105
摘要 .....	105
参考文献 .....	105
习题 .....	106
<b>第六章 蛋白质: 三维构象 .....</b>	<b>108</b>
构型和构象 .....	108
纤维状蛋白 .....	109
角蛋白 .....	109
角蛋白的 X 射线分析 .....	109
$\alpha$ -螺旋和 $\alpha$ -角蛋白的结构 .....	111
多肽链的可允许性和不可允许性构象: Ramachandran 图 .....	114
$\beta$ -角蛋白: $\beta$ 构象与褶叠片 .....	116
胶原 .....	117
球状蛋白的三级结构 .....	119
球状蛋白的氨基酸顺序对其三级结构的规定作用 .....	123
低聚蛋白的四级结构 .....	126
蛋白质构象的探测 .....	131
三级结构的推测 .....	133
摘要 .....	133
参考文献 .....	134
习题 .....	134
<b>第七章 蛋白质: 提纯与鉴定 .....</b>	<b>136</b>
蛋白质在溶液中的行为 .....	136
根据分子大小进行分离的步骤 .....	136

按照溶解度差异进行分离的步骤 .....	139
根据电荷进行分离的步骤 .....	142
用选择性吸附法分离蛋白质 .....	146
根据配体特异性进行分离: 亲和层析 .....	146
蛋白质的提取与纯制 .....	147
蛋白质分子的鉴定 .....	149
亚基数目和分子量的测定: 十二烷基硫酸钠 (SDS)-凝胶电泳 .....	154
摘要 .....	155
参考文献 .....	155
习题 .....	156
<b>第八章 酶: 动力学与抑制</b> .....	<b>157</b>
酶类的命名与分类 .....	157
酶的辅助因子 .....	159
化学动力学 .....	160
活化自由能和催化剂的效应 .....	162
酶催化反应的动力学: Michaelis-Menten 方程式 .....	163
Michaelis 常数 $K_M$ 和底物常数 $K_s$ .....	167
Michaelis-Menten 方程式的变换 .....	168
pH 对酶活性的效应 .....	169
温度对酶促反应的效应 .....	169
酶抑制作用 .....	170
不可逆抑制: 酶的修饰 .....	173
有两个或更多底物的酶促反应的动力学 .....	174
酶活性的定量测定 .....	178
酶活性单位 .....	179
酶的纯化 .....	179
酶-底物复合物和共价的酶-底物化合物 .....	180
活细胞中的酶类和底物 .....	181
摘要 .....	182
参考文献 .....	182
习题 .....	183
<b>第九章 酶: 作用机理、结构和调节</b> .....	<b>186</b>
酶对底物的特异性 .....	186
催化作用必需的功能基团的鉴定 .....	188
与酶催化效率有关的因素 .....	190
酶活性部位上的某些反应机理 .....	198
调节酶 .....	201
变构酶 .....	202
共价调整的调节酶类 .....	209



酶原的共价激活 .....	210
同功酶 .....	211
摘要 .....	212
参考文献 .....	213
<b>第十章 糖类、储存多糖和细胞壁 .....</b>	<b>215</b>
单糖类 .....	215
单糖的立体异构现象 .....	215
变旋现象和 D-葡萄糖的异头形态 .....	217
酸和碱对单糖的作用 .....	220
单糖类的重要衍生物 .....	221
双糖类 .....	227
三糖类 .....	227
单糖类和低聚糖类的鉴定和分析 .....	228
多糖(聚糖) .....	229
储存多糖 .....	229
结构多糖 .....	232
酸性粘多糖 .....	237
糖蛋白 .....	238
摘要 .....	240
参考文献 .....	241
习题 .....	241
<b>第十一章 脂类、脂蛋白与膜 .....</b>	<b>242</b>
脂类的分类 .....	242
脂肪酸 .....	242
三酰基甘油(甘油三酯) .....	246
烷基酰基甘油类 .....	249
糖基酰基甘油类 .....	250
磷酸甘油酯类 .....	250
鞘脂类 .....	254
蜡类 .....	258
简单的(非皂化的)脂类 .....	258
前列腺素 .....	261
脂质胶粒, 单层与双层 .....	263
脂蛋白系统 .....	264
血浆的运输脂蛋白类 .....	264
膜 .....	265
摘要 .....	268
参考文献 .....	268
习题 .....	269

<b>第十二章 核苷酸与核酸的共价结构</b>	270
核苷酸的一般结构	270
嘧啶类和嘌呤类	271
核苷类	274
核苷酸类	274
核酸	278
核酸主链的缩写	282
用酸和碱水解核酸	283
核酸的酶水解	283
核酸中核苷酸顺序的分析	284
核酸-蛋白质超分子复合物	287
摘要	290
参考文献	290
习题	291
<b>第十三章 维生素与辅酶</b>	293
维生素的分类	294
硫胺素(维生素 B <sub>1</sub> ) 与硫胺素焦磷酸酯	294
核黄素(维生素 B <sub>2</sub> ) 与黄素核苷酸	296
烟酸与吡啶核苷酸类	297
泛酸与辅酶 A	299
维生素 B <sub>6</sub> 与吡哆醇辅酶	300
生物素与生物胞素	302
叶酸及其辅酶形式	303
硫辛酸	304
维生素 B <sub>12</sub> 与 B <sub>12</sub> 辅酶类	306
维生素 C	307
其它水溶性生长因素	308
脂溶性维生素	309
维生素 A	309
维生素 D	312
维生素 E	313
维生素 K	314
摘要	315
参考文献	316

## 第 II 篇 分解代谢与磷酸键能的产生

<b>第十四章 代谢途径与能量转移途径: 中间代谢概貌</b>	318
细胞生活所需的碳源和能源	318



碳和氧循环 .....	319
氮循环 .....	319
生物界的能量流动 .....	320
机体和细胞在营养上的相互依存 .....	321
中间代谢的灵活性和经济利用 .....	322
分解代谢和合成代谢 .....	322
多酶体系 .....	323
分解、合成和无定向代谢途径 .....	324
细胞内的能量循环 .....	326
代谢转换: 细胞组分的动态 .....	327
中间代谢的实验研究方法 .....	328
酶和酶系的细胞内区域化 .....	333
代谢途径的细胞调节 .....	334
摘要 .....	335
参考文献 .....	336
习题 .....	336
<b>第十五章 生物能原理与 ATP 循环 .....</b>	<b>338</b>
ATP 循环 .....	338
ATP、ADP 和 AMP 的发现及性质 .....	339
自由能 .....	340
化学反应的标准自由能变化 .....	341
放能和吸能反应 .....	343
生物化学能学中的规定 .....	343
$\Delta G^0$ 的计算示例 .....	344
标准自由能变化的相加性 .....	344
从生成标准自由能计算 $\Delta G^0$ .....	345
磷酸化合物水解的标准自由能 .....	346
ATP 水解的标准自由能 .....	347
ATP 水解时自由能变化的结构基础 .....	349
对 ATP 水解的 $\Delta G^0$ 有影响的条件 .....	350
磷酸根的转移潜力 .....	351
共同中间产物原理: 偶联反应 .....	351
磷酸根到 ADP 的酶促转移 .....	352
磷酸根从 ATP 到各种受体的转移 .....	355
磷酸根转移的酶促途径 .....	355
酶促反应的标准自由能变化及生物学上的可逆性 .....	356
高能磷酸根的贮存 .....	356
磷酸根通过其它 5'-三磷酸核苷的渠道 .....	357
AMP 及焦磷酸的功用 .....	358

细胞内磷酸根转换的动力学 .....	359
开放系统的能学 .....	359
摘要 .....	360
参考文献 .....	361
习题 .....	361
<b>第十六章 糖酵解</b> .....	363
发酵和呼吸 .....	363
糖酵解和酒精发酵的平衡表 .....	365
实验史 .....	365
糖酵解的阶段 .....	366
糖酵解第一阶段的酶促步骤 .....	368
糖酵解的第二阶段 .....	372
总平衡表 .....	377
完整细胞中糖酵解的能学 .....	377
其它糖类进入糖酵解序列的通路 .....	379
双糖的进入 .....	381
葡萄糖以外的单糖的进入 .....	381
酒精发酵 .....	382
无氧发酵的其它类型 .....	384
摘要 .....	384
参考文献 .....	384
习题 .....	385
<b>第十七章 三羧酸循环与磷酸葡萄糖酸通路</b> .....	387
发酵与呼吸的能学 .....	387
呼吸作用的流程 .....	387
三羧酸循环的发现 .....	390
三羧酸循环的酶类在细胞内的部位 .....	392
丙酮酸氧化成乙酰 CoA .....	392
三羧酸循环的反应 .....	395
三羧酸循环的同位素试验 .....	403
环的无定向性质: 回补反应 .....	405
三羧酸循环的调节 .....	406
乙醛酸循环 .....	406
磷酸葡萄糖酸通路 .....	408
摘要 .....	412
参考文献 .....	413
习题 .....	414
<b>第十八章 氧化还原酶类和电子传递</b> .....	416
氧化-还原反应 .....	416



电子转移酶的种类 .....	419
需要吡啶的脱氢酶类 .....	419
需要黄素的脱氢酶类和氧化酶类 .....	423
铁-硫蛋白 .....	426
细胞色素类 .....	428
泛醌(辅酶 Q) .....	430
电子传递途径: 呼吸链 .....	431
电子传递的抑制剂 .....	433
电子传递时的质子交换 .....	434
关于线粒体电子传递链的一些未能肯定的问题 .....	435
电子传递的能学 .....	435
吡啶核苷酸转氢酶 .....	436
其它膜系统内的电子传递 .....	436
通过加氧酶来利用氧 .....	437
微粒体的电子传递 .....	438
超氧化物歧化酶和过氧化氢酶 .....	439
将氧化-还原能量转化成生物发光 .....	440
摘要 .....	440
参考文献 .....	441
习题 .....	442
<b>第十九章 氧化磷酸化、线粒体结构和呼吸代谢的分隔现象 .....</b>	<b>444</b>
线粒体的结构 .....	444
线粒体内酶的定位 .....	445
内膜的结构组成 .....	448
氧化磷酸化作用 .....	449
氧化磷酸化作用与电子传递的偶联 .....	450
葡萄糖氧化的能量平衡图 .....	451
电子传递速率的受体调节 .....	452
氧化磷酸化作用的解偶联和抑制 .....	454
氧化磷酸化作用的分部反应 .....	455
磷酸化电子传递作用的可逆性 .....	456
亚线粒体系统中的氧化磷酸化作用 .....	456
偶联因子和氧化磷酸化作用的重建 .....	457
氧化磷酸化作用的机制 .....	458
内膜中的代谢物运输系统 .....	463
代谢物运输与电子传递的偶联 .....	465
通过线粒体运输依赖于呼吸作用的 $\text{Ca}^{2+}$ .....	465
电子从外界(胞汁中) $\text{NADH}$ 进入线粒体的梭系 .....	467
还原力从线粒体向胞汁的移动 .....	469

糖酵解和呼吸作用的整合: 巴斯德效应 .....	469
ATP 系统的能量载荷 .....	471
磷酸化势能 .....	472
摘要 .....	473
参考文献 .....	473
习题 .....	474
<b>第二十章 脂肪酸的氧化</b> .....	476
脂肪酸的来源 .....	476
脂肪酸氧化的途径 .....	476
脂肪酸氧化循环的概貌 .....	478
脂肪酸氧化中的第一个脱氢步骤 .....	480
水化步骤 .....	481
第二个脱氢步骤 .....	482
裂解步骤 .....	482
平衡表 .....	483
平衡代谢总反应式 .....	483
不饱和脂肪酸的氧化 .....	484
酮体及其氧化 .....	486
奇数碳脂肪酸的氧化和丙酰辅酶 A 的去向 .....	487
脂肪酸氧化的次要途径 .....	489
摘要 .....	489
参考文献 .....	490
习题 .....	490
<b>第二十一章 氨基酸的氧化降解</b> .....	491
蛋白质水解作用 .....	491
氨基酸氧化过程图解 .....	492
转氨作用 .....	493
氧化脱氨作用 .....	496
生成乙酰 CoA 的途径 .....	497
$\alpha$ -酮戊二酸途径(精氨酸、组氨酸、谷氨酰胺、谷氨酸和脯氨酸) .....	504
琥珀酸途径(甲硫氨酸、异亮氨酸和缬氨酸) .....	506
延胡索酸途径(苯丙氨酸和酪氨酸) .....	508
草酰乙酸途径(天冬酰胺和天冬氨酸) .....	508
氨基酸的脱羧作用 .....	508
含氮排泄物的形成 .....	508
尿素循环 .....	509
氨的排泄 .....	512
尿酸的形成 .....	513
摘要 .....	513



参考文献 .....	514
习题 .....	514
<b>第二十二章 光合电子的传递和磷酸化作用</b> .....	<b>516</b>
几个历史性标志 .....	516
生物中光合作用的发生 .....	517
光合系统的细胞内结构 .....	517
光合作用的基本过程 .....	519
光反应和暗反应 .....	521
光对分子的激发 .....	521
光合色素 .....	522
Hill 反应和光诱发的电子传递 .....	525
光合磷酸化作用 .....	526
植物光合作用的两类光反应 .....	526
非循环的电子流与非循环的光合磷酸化作用 .....	528
光合电子传递中的能量关系 .....	529
电子从光合系统 I 传递到 $\text{NADP}^+$ .....	531
电子从光合系统 II 传递到光合系统 I .....	531
电子从水传递到光合系统 II .....	532
循环的光合电子传递和循环的光合磷酸化作用 .....	532
光合作用的能学 .....	533
光合磷酸化作用的特性; 偶联因子 .....	534
光合磷酸化作用的机制 .....	536
植物的呼吸作用和光呼吸作用 .....	537
摘要 .....	537
参考文献 .....	538
习题 .....	539
<b>译后记</b> .....	<b>541</b>

1. The first part of the document is a list of names and addresses of the members of the committee.

2. The second part of the document is a list of names and addresses of the members of the committee.

3. The third part of the document is a list of names and addresses of the members of the committee.

4. The fourth part of the document is a list of names and addresses of the members of the committee.

5. The fifth part of the document is a list of names and addresses of the members of the committee.

6. The sixth part of the document is a list of names and addresses of the members of the committee.

7. The seventh part of the document is a list of names and addresses of the members of the committee.

8. The eighth part of the document is a list of names and addresses of the members of the committee.

9. The ninth part of the document is a list of names and addresses of the members of the committee.

10. The tenth part of the document is a list of names and addresses of the members of the committee.

11. The eleventh part of the document is a list of names and addresses of the members of the committee.

12. The twelfth part of the document is a list of names and addresses of the members of the committee.

13. The thirteenth part of the document is a list of names and addresses of the members of the committee.

14. The fourteenth part of the document is a list of names and addresses of the members of the committee.

15. The fifteenth part of the document is a list of names and addresses of the members of the committee.



## 绪论 活机体的分子逻辑

生物是由无生命的分子组成。将这些分子分离出来并逐个分别检查时，它们完全符合于无生命物质运动所遵循的物理、化学定律。然而，活机体具有一些突出的特性，而一堆无生命物质是不能显示出这些特性的。如果我们先研究其中某些特性，我们学习生物化学时就能更好地理解这门学科所试图解决的那些基本问题。

### 鉴别生活物质的特征

活机体最显著的特征可能是它们极为复杂而组织严密。构成活机体的细胞具有复杂的内部结构，其中包含了多种复杂的分子。此外，活机体具有极其大量的不同种别。与此相反，在我们周围的无生命物质，如土壤、水、岩石，常常只是一些简单化合物的任意混合，比较起来很少有结构上的组织。

第二，活机体的每一个组成部分似乎都有特殊用途或机能。不但那肉眼可见的结构如翅、眼、花或叶是这样，而且细胞内结构如核、细胞膜也是这样。不仅如此，细胞内每一种化合物如脂类、蛋白质、核酸也各有特殊机能。询问活机体内某一个分子的机能是什么，这是完全合理的。但是对于一堆无生命物质中的分子也提出这样的问题就是荒谬的、毫无意义的。

第三，活机体有从它们的周围环境中摄取和转变能量的能力，它们利用这种能力从简单原料建造和维持它们本身复杂的结构。它们还能作其它形式的有用的功，例如运动时的机械功。无生命物质不能利用外界能量来维持它本身的组织结构。事实上，无生命物质吸收了外界的热和光这样的能量以后，常常衰变成更为纷乱的状态。

活机体最为突出的特征是它们具有精确地自我复制的能力，这一特征可以看作是生命状态的精华。与此相反，一堆堆的无生命物质却不能以相同的大小、形态及内部结构一代一代地繁殖。

### 生物化学与生命状态

现在我们可能要问：如果活机体是由本质上是无生命的分子所构成的，无生物也是由本质上是无生命的分子所组成的，为什么生物竟然这样完全不同于无生物呢？为什么活机体似乎不止是它那些无生命部分的总和呢？早期的哲学家曾回答说：活机体有一种天赋的、神秘的和神圣的生命力。但是这种称为活力论的教理只不过是一种迷信，已经完全被现代科学所摒弃。当前生物化学这一学科的中心目标是要确定，活机体中这些无生命分子是怎样相互作用以构成、维持和保存生命状态的。

生物化学是一门非常年轻的科学。直到前几十年，只有很少几个大学承认它本身就是一门科学。现代生物化学谱系中有两个体系。一个体系来自医学和生理学，这是早期

对血、尿和各组织的化学成分,以及它们在健康和疾病中的变异进行探讨的副产品。另一体系要追索到有机化学,追索到最初对天然有机化合物的结构进行的研究工作。有很长一段时期,生物化学仅仅被看作是生理学的一个分支或化学的一个分支。直到四分之一世纪前,生物化学本身并不是以一个具有强有力的实验方法的、对于生物学现象具有预见能力、真正成熟了的科学出现的。两个重大的发展使生物化学达到了这样的境界。一个是发现了在主要的代谢途径中作为催化单位的多酶系统,以及关于活细胞内能量转移的统一假说的发展。另一个有着极为广泛而深远的影响,那就是发现了生物学的一个最基本方面——遗传,具有合理的分子基础。当前,生物化学正对生物学的一系列基本领域进行着激动人心的探索,包括细胞与机体的分化、生命的起源和进化、行为和记忆,以及人类疾病。这些探索已经证明了用生物化学方法能够有成效地澄清这些基本问题。

事实上,生物化学在阐明很多细胞现象中获得了很大的成功,以致很多科学家得出一个结论:生物学即化学。有些生物学家不同意这种观点,他们坚持复杂的活机体的本质或整体不能降低到分子和分子间相互作用的水平。但这是少数人的看法。今天,作为一种工作哲学,可能比较合乎逻辑的观点是假设所有的生物学现象最终都是建立在分子基础上的,只有当这种观点对于设计严格的实验和说明实验记录已经不再有用时再放弃它。但是,我们决不能将生物学看作是有机化学、物理化学或无机化学那样,仅仅是传统的化学的另一个分科。如果生物学是化学,它就必然是一种“超化学”,它包括了、同时又超出了化学的传统范畴。这是因为活机体内的分子不仅遵循那些支配所有各种分子运动的一般物理学和化学原理,而且它们还按照另外一套原理而相互作用,我们将这一套原理称为生命状态的分子逻辑。这些原理并不一定涉及什么新的或尚未发现的物质的定律或力量。不如将它们看作一套基本规律,这一套基本规律支配着活体内各种特殊类型分子的性质、机能和相互作用,并使它们具有自我组织和自我复制的能力。并不是组成生命状态分子逻辑的全部原理都已经被认识清楚了,确实其中有些还只是模糊地感觉到。事实上,将这些原理称为公理或假说也许更合适一些,因为它们中有些只是凭直觉公认的,而并不是能够证明的。

现在让我们看看,我们能不能识别生命状态的分子逻辑中某些重要的公理。我们将从扼要地分析生命物质中分子的结构与机能开始,今后我们称这些分子为生物分子。

## 生 物 分 子

活机体的化学组成与它们生活的物质环境中的化学组成在性质上大不相同。活机体的化学组分,绝大部分是碳的有机化合物,其中的碳是比较还原了的或氢化了的。很多有机生物分子也含氮。与此相反,在无生物中碳和氮这两种元素却相当少,不仅如此,在大气和地壳中,它们只是以简单无机物的形式出现的,例如二氧化碳、分子氮、碳酸盐和硝酸盐等。

在有生命物质中有机化合物极其多种多样,而且其中绝大多数是极为复杂的。即使是最简单最小的细胞——细菌——也含有很多不同种类的有机分子。据估计大肠杆菌含有约 5,000 种不同的有机化合物,其中包括大致 3,000 种不同的蛋白质和 1,000 种不同的核酸。而且在活细胞内绝大多数有机物质是由巨分子组成的,具有很大的分子量,其中不



仅有蛋白质和核酸,而且还有一些多聚物质,如淀粉、纤维素等。

如果我们转向较大和较复杂的生物(高等动物和植物),我们会发现它们含有的蛋白质和核酸的种类还要多得多。例如,在人体可能有多至 100,000 种不同的蛋白质,而大肠杆菌只有约 3,000 种。虽然大肠杆菌细胞中某些蛋白质的机能与人体细胞内某些蛋白质的机能完全相同,但是大肠杆菌的蛋白质分子没有一种是与人的任何蛋白质分子相同的。确实如此,每一种生物都各自有一套化学上特殊的蛋白质和核酸分子。由于大概有 1,500,000 种以上的生物,按此推算,所有各种生物必然总共含有约  $10^{10}$  到  $10^{12}$  种不同的蛋白质和大致  $10^{10}$  种不同的核酸。现在有机化学家已经查明了结构的有机化合物总数只不过约一百万或  $10^6$  种;和这一数字比较就很清楚,现在认为存在于生物体内的全部有机分子中,我们已知其精确结构的仅仅是极少极少的一部分。因此,对于一个生物化学家说来,企图分离、鉴定和合成生命物质中所有各种有机分子,也许是一个毫无希望的意图。

然而,与此相反,生物机体中有机分子的极其多种多样,最终又可以简化到料想不到的简单程度。我们现在已经知道,细胞内的大分子是由简单的、小的基本单位分子连接成长链所构成的。淀粉和纤维素是由以共价键联成长串的葡萄糖分子组成的。不同类型的蛋白质都是氨基酸残基以共价键串连成长链而组成的,而氨基酸是已知其结构的小有机化合物。在蛋白质中只发现了 20 种不同的氨基酸,但是它们按照各种不同的顺序排列,形成很多种不同的蛋白质。因此,在大肠杆菌中所有 3,000 种以上的蛋白质,都是由仅仅 20 种不同的小分子构成的。同样,大肠杆菌细胞的一千余种核酸,包括脱氧核糖核酸(DNA)和核糖核酸(RNA)两类,是由总共 8 种不同的、称为单核苷酸的基本单位构成的,四种单核苷酸是 DNA 的基本单位,另四种是 RNA 的基本单位。不但如此,在所有各种生物中,构成蛋白质基本单位的 20 种氨基酸和构成核酸的 8 种单核苷酸都是相同的。虽然我们已经精确地知道其共价结构的蛋白质今天还不到 100 种,但是蛋白质化学的技术已发展到足够的水平,以致生物化学已经有可能弄清楚任何一种生物的任何一种蛋白质的结构。

构成所有各种大分子的极少数简单的基本分子又有另一个突出的特征。每一种基本单位在细胞内都能完成不止一种机能;事实上,其中有一些是极其多能的,具有好些不同的功用。氨基酸不仅是构成蛋白质分子的基本单位,而且也是构成激素、生物碱、卟啉、色素和其它很多生物分子的前身。各种单核苷酸不仅是构成核酸的基本单位,也可以构成辅酶和载能的分子。看来这些作为基本单位的生物分子,也许正是由于它们具有完成多种机能的能力,因而在生物进化过程中被挑选出来了。就我们所知道的,通常在活机体内不含有不执行机能的化合物,虽然有些生物分子的机能现在还不清楚。

现在我们可以看到,生命状态分子逻辑的某些规律已显现出来。既然存在于细胞内的成千上万种不同的大分子都是由极少数简单的基本单位分子构成的,我们可以将第一条规律简述为:在细胞的分子组成中有一种内在的单纯性。由于在所有已知的各种生物中这些基本单位生物分子都相同,我们可以推知另一条规律:所有生物都来自一个共同的祖先。由于每一种生物都各自有一套核酸和蛋白质,另一条规律表现为:每一生物种各有一套独特的核酸和蛋白质,因而各自保存了显著的特征。此外,基本单位生物分子都具有多种机能,由此我们可以作出另一点推论:有一条分子经济原则在支配着。也许生物细胞含有最少数不同类型的尽可能简单的分子,刚刚足以使它在所生存的环境条件下

具有生命的属性和种别的特征。

## 活细胞中的能量转换

活机体中分子的复杂性与结构的规律性,与无生物结构的凌乱情况恰恰相反,这对于物理科学家说来有深刻的含意。热力学(物理学中研究能量及其转换的一个分支学科)第二定律提出,所有的物理和化学过程总是同时要增加世界上的无秩序状态或凌乱状态,即它的熵增加。那么,为什么在一个相当混乱而且越来越混乱的环境中,活机体却能产生和保持它们复杂的规律性呢?

活机体并不构成热力学定律的例外。它们分子结构的高度规律性必然是以某种方式付出了代价的,因为这不可能从混乱状态中自然发生。热力学第一定律提出,能量既不能创造也不能消灭。因此,活机体不可能消耗或用完能量,它们只能将一种形式的能转换成另一种。它们从环境中吸取一种形式的能,这种形式的能是在它们生存的特定温度和压力条件下对它们有用的;然后,又将同等量的能以另一种比较少被利用的形式退还给环境。细胞所摄取的可利用的能称为自由能。可以为自由能下一个简单的定义,即那种在恒温恒压下可以作功的能。细胞还给环境的那些比较少用的能,包括热和其它形式,它们迅速散布于环境中,增加环境的紊乱状态或熵。现在我们可以提出生命状态分子逻辑的另一条重要规律:活机体在损害其环境的基础上产生和保持它们必不可少的规律性,从而使其环境更加无秩序和混乱。

对于活机体说来,它们的环境是绝对必要的,环境不仅是自由能的来源,而且也是原料的来源。用热力学的语言说,活机体是开放系统,因为它们与环境交换能量和物质,而且在这一过程中又转化能量和物质。开放系统的特征是,它们并不与其环境平衡。虽然活机体可能看来象是处于平衡状态,因为在我们观察的一段时间内可能没有可见的变化,但实际上它们常常是处于一种稳态之下。稳态是开放系统的一种情况,在这种情况下,物质和能量从环境转入这一系统的速率与它们从这一系统转出的速率完全相等。因此,细胞是一个不平衡的开放系统,是一种从环境中摄取自由能的机器,从而使环境中紊乱状态增加,这也是生命状态分子逻辑的一个部分。不仅如此,活细胞利用物质和能量的效率非常高,这是最经济法则的另一反映。它们将输入的能量转变为功的效率远远超过了绝大多数人类制造的机器。

活细胞中能量转化的机构全都是由比较容易断裂和比较不稳定的有机分子构成的,它们不能耐受高温、强电流、极端强的酸性或碱性的环境。活细胞也基本上是等温的,在任何时候,细胞各部分的温度基本上相同。此外,细胞各部分之间没有显著的压力差。因此,细胞都不能利用热作为能源,因为在恒压条件下,热能只有从一个高温区域流向一个低温区域时才能作功。所以,活细胞不同于我们非常熟悉的那些热引擎或电动机。它们是遵循生命状态分子逻辑中又一条重要的规律:活细胞的功能如同恒温化学引擎。细胞从环境中摄取的能转变成化学能,然后用于完成细胞成分生物合成中所涉及的化学功、物质运进细胞所需的渗透功或收缩和运动所需的机械功;所有这些转化都是在基本上恒温的条件下进行的。

在通常的人工制造的机器中,我们看到,很少能在恒温下利用化学能来作功的。实际



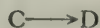
上、制造工艺学仍然须要创造一种适用的机器，能够在恒温条件下将化学能转变为机械能；而在肌肉收缩中这种类型的能量转换则是我们都很熟悉的。

## 活细胞中的化学反应

细胞能够作为一个化学引擎是因为它们含有能够大大加速专一化学反应的催化剂——酶类。酶是高度专一化的蛋白质分子，是细胞从简单氨基酸合成的。每一类酶只能催化一类特殊的化学反应，已知的酶差不多有两千种。在催化反应的专一性、催化效率，以及在适中的温度与氢离子浓度条件下催化的能力等方面，酶都远远超过了人造的催化剂。在化学实验室中需要数天、数周或数月才能完成的复杂反应序列，而酶类能在数秒之内催化完成。

在活细胞内的化学反应有一个特别值得注意的特征，这一特征终于使活细胞可能成为化学引擎而有效地活动，即酶催化的反应能进行到产量高达 100% 而没有副产品。与此相反，在实验室中，使用人造催化剂的有机化学反应，几乎总是有一种或多种副产品形成，因而产量常常远远低于 100%，而且每一步都需要用大力提纯产品。由于酶能加速某一分子的某一单个反应进程而不致加速它的其它可能的反应，因而活机体能够同时进行很多种不同的单个反应而不致陷入一大堆无用的副产品之中。酶有这样大的特异性是生命状态分子逻辑中另一个基本规律在起作用的结果：细胞内分子相互作用的特异性来源于相互作用的分子之间的结构互补。在催化循环中酶分子与其底物是这样结合的，即酶分子的活性部位与底物相符合，有如近乎完全相合的锁与钥匙那样的结构互补。我们将看到，结构互补原则是构成细胞内很多种不同类型的分子间相互作用特异性的基础。

在细胞内发生的数百种酶促化学反应并不是各自独立进行的，而是联接成为连续反应的系列，这些连续反应具有共同的中间产物；于是，第一个反应的产物成为第二个反应的底物或反应物，依此类推。随处都可能有由 2 到 20 个以上反应步骤相衔接或相偶联成为这种系列，而这些系列又进一步联接组成具有会聚型或辐散型反应途径的反应网。这种部署有好几种重要的生物学意义。一是这种连续反应系统为化学反应按照特定路线进行到特定的终产物开拓了途径。其次是这种连续反应使得化学能有可能转换。除非两个反应有共同的中间产物，否则在恒温恒压条件下，两个反应之间不可能发生能量转移。如果是两个独立的反应，如：



发生于同一容器中，并处于恒温恒压条件下，在每个反应进行中同样都会减少自由能，不管另一反应存在与否。然而在两个连续反应，如：



则 A 的某些化学能可以由共同的中间产物 B 转移到 C。

活细胞可以按照它们从环境中所获得的能的类型不同而分为两大类。光合细胞 (photosynthetic cell)，利用太阳光作为它们的主要能源；放射能由叶绿素吸收后再转变为化学能。异养细胞 (heterotrophic cell)，分解从环境中得来的、像葡萄糖那样高度还原了的富

于能量的有机分子以获得能。动物界中绝大多数细胞属于异养细胞。在异养细胞中,葡萄糖氧化成为二氧化碳和水;在这一过程中,葡萄糖分子的一些自由能被保存下来,然后用来完成细胞内各种类型的功。

虽然这两类机体从环境中所获得能的类型不同,但都是将它转变成化学能,主要是转变成三磷酸腺苷(ATP)这种化合物的形式。ATP的功能是在所有生活物种的细胞中充当化学能的主要载体。当ATP将它的能量转移给其它分子时,它就失去它末端那个磷酸根成为二磷酸腺苷(ADP)。ADP相当于卸了能量的、或能量贫乏的ATP对应物。ADP又能在消耗太阳能(在光合细胞中)、或消耗化学能(在异养细胞中)的基础上重新获得一个磷酸根时,再次接受化学能而成为ATP。ATP成了细胞内两个大酶促反应网的共同中间产物或联系的环节。其中一个酶促反应网使能量贫乏的ADP磷酸化成为能量丰富的ATP,从而保存了自环境中获得的化学能。另一个反应网则利用ATP的能量将简单的前身物合成为细胞成分,与此同时ATP分解成ADP。现在我们可以提出细胞的分子逻辑的另一条规律:循序衔接的酶促反应系列为将化学能从供能过程转移到需能过程提供了途径。

## 细胞内反应的自我调节

细胞内一切化学反应都是酶促反应,而且由共同的中间产物相互连接,这一事实导致另一个重要结果。一个简单的细菌细胞,如大肠杆菌,从三种简单的前身物——葡萄糖、氨和水——同时合成它那全部几千种不同的复杂分子成分。这里活细胞所运用的一种化学逻辑是实验室中现代合成化学工艺仍然做不到的。如果一位化学家面对综合两种产品的问题,假如说一种氨基酸和一种脂肪,他做梦也不会想到在同一个反应器中从同样的前体同时合成出这两种产品来。他必然会用不同的前体开始每一种合成,而且会利用不同的反应程序。他必然会分别用不同容器,也许还会在不同的时间分别进行这两种产品的合成。然而在活细胞中,无数种大不相同的分子却是从少数几种共同的前体,从字义上说也是在同一容器中,同时合成的。酶促反应连接成有一定顺序的连续反应,使得细胞内发生的几千种化学反应能够有条不紊地循序进行,因而细胞结构和机能所必需的各种特殊生物分子能够按准确的数量和速度产生。

一个细菌细胞同时合成大约3,000种以上不同的蛋白质分子,而且它们相互间保持一定的克分子比值。其中每一个蛋白质分子含有一条至少有100个氨基酸单位组成的链;大多数蛋白质分子含有的氨基酸更多得多。然而在37℃下,细菌细胞只需要很少几秒钟来完成任一种蛋白质分子的合成。形成鲜明对照的是,在实验室内人工合成一种蛋白质,要高度熟练的化学家的操作、许多贵重试剂、几百道分别的操作过程、复杂的自动化装备,以及好几个月的准备和工作。细菌细胞不但能够很迅速地制造单个蛋白质分子,而且还能按照构成有机能的活细胞所要求的精确克分子比值,同时制造3,000种以上不同的蛋白质。

酶促反应连接成连续的系列,使代谢调节成为可能,并赋予它自我调节的特性。最简单的情況是,一种代谢终产物,例如,一种氨基酸过分堆积,能抑制形成这种产物的反应系列中的限速步骤,这一类型的控制称为反馈抑制。此外,活细胞还能调节它自身的催化



剂的合成。当细胞能够从环境中获得某种现成的产物时,从前体合成这种产物的酶在细胞内的合成过程就能够“暂停”。于是我们又有另一条重要原则:细胞能够调节它们自己的代谢反应以及它们本身酶类的生物合成,从而达到最高效率和最经济。

## 活机体的自我复制

活细胞的所有各种特征中最突出的是,它们具有几乎完全一模一样地复制它们自身的能力;而且不只是传一代或两代(虽然这已经是很不平凡了),而是传几百代、几千代。这立刻显出了三个特点。第一,有些活机体是那么极端复杂,以致它所传送的遗传信息的数量与必需携带这些信息的细胞,即单个精子或单个卵子那样小的体积比较,似乎太不相称了。但是今天我们知道,事实上所有遗传信息都在极小量的 DNA 中,以单核苷酸基本单位按一定顺序排列的方式组成密码,存在于染色体中。在一个人类精子或卵子中, DNA 总重量不超过 6 微微克( $\mu\text{g}$ ,  $1 \text{ 微微克} = 1 \times 10^{-12} \text{ 克}$ )。关于遗传的生物化学方面的近代研究,导致生命状态分子逻辑的又一条规律: DNA 中遗传信息编码符号是亚分子大小。

活机体自我复制特性的第二个突出的特点是,贮存于 DNA 中的遗传信息异常稳定。人类制作的早期历史记录即使用铜刻或石刻来保存,能保存很久的也很少。例如死海卷轴(Dead Sea scrolls)和蔷薇石(Rosetta stone)也不过几千年之久。但是有充分的理由相信,今天的细菌和几亿年以前的活细菌有差不多相同的大小、形状和内部结构,含有同样类型的基本分子和同样的酶类,尽管细菌也和其它所有生物一样经常在进化。遗传信息不是保存在铜卷或石刻上,而是以脱氧核糖核酸的形式保存的。DNA 是很脆的有机分子,当它在溶液中分离时,仅仅搅拌溶液或用移液管吸取溶液,就会断裂成很多碎片。

活细胞具有保存遗传信息的能力是由于结构互补法则在起作用。一条 DNA 链作为另一条结构和它互相补充的 DNA 链酶促复制的模板。事实上,没有模板细胞的 DNA 合成酶类就不能制造 DNA。总之,值得注意的是,即使在完好的细胞中, DNA 分子也常常可能破裂,但又由特殊的酶类很快地自行修复了。误差或变异是罕见的,而且就是有变异也不总是破坏性的,因为对于使某一种生物机体在进化过程中逐步改变其特征以便更好地适应环境的变化,变异也可能是有益的。

在活机体中遗传信息的传递还有第三个引人注目的特点。遗传信息是以四种基本核苷酸单位的形式按特定顺序在直线排列的多聚 DNA 分子上编码的。但活细胞的结构是三维空间的,它们的部件或组成成分也是三维空间的。这里我们遇到生命状态的分子逻辑中又一条非常重要的规律,这一条规律提供了将 DNA 简单的直线化学与无数种多细胞机体的全部三维空间属性联系起来的环节:通过将 DNA 的结构翻译成蛋白质的结构, DNA 的一维空间信息就被翻译成活机体的大分子或超分子组分。在蛋白质合成过程中, DNA 上特定的直线的碱基顺序被翻译成相应多肽链上直线的氨基酸顺序。然而和 DNA 分子不同,多肽不能以伸展的直线形式保持稳定。它自动地卷曲和折叠成一种特殊的、稳定的三维空间结构,其具体构型则决定于此肽链上氨基酸的特定顺序。每一种多肽链各有其特殊的三维空间构型,这又反过来赋予肽链以特殊的生物活性。不仅如此,很多种蛋白质分子构成膜、核糖体和细胞器等生物结构的组成成分,它们能互相识别和自

动组合成为能够精确复制的三维空间装置，因为这些分子之间也只能按一种特定方式相互契合，同样这也是符合于结构互补原则的。

现在我们叙述了生物分子之间一些具有特征的相互作用和相互关系，这些相互作用和相互关系共同构成了生命状态的分子逻辑。我们可以将这些原则概括如下：一个活细胞是一个自我组合的、自我调节的、自我复制的、等温的、开放的有机分子系统，这个系统是按照各部分和过程的最经济的原则运转的；这个系统利用自己制造的有机催化剂促进很多循序衔接的有机反应以进行能的转换和它本身组分的合成。在我们审查活细胞的分子逻辑时，没有在任何一点上遇到任何违反已知的物质定律，或是需要确定任何新定律的问题。活细胞机器也在支配人造机器活动的那一套规律下活动，但是细胞的化学反应和化学过程其细致准确的程度远远超过了当前化学工艺的水平。

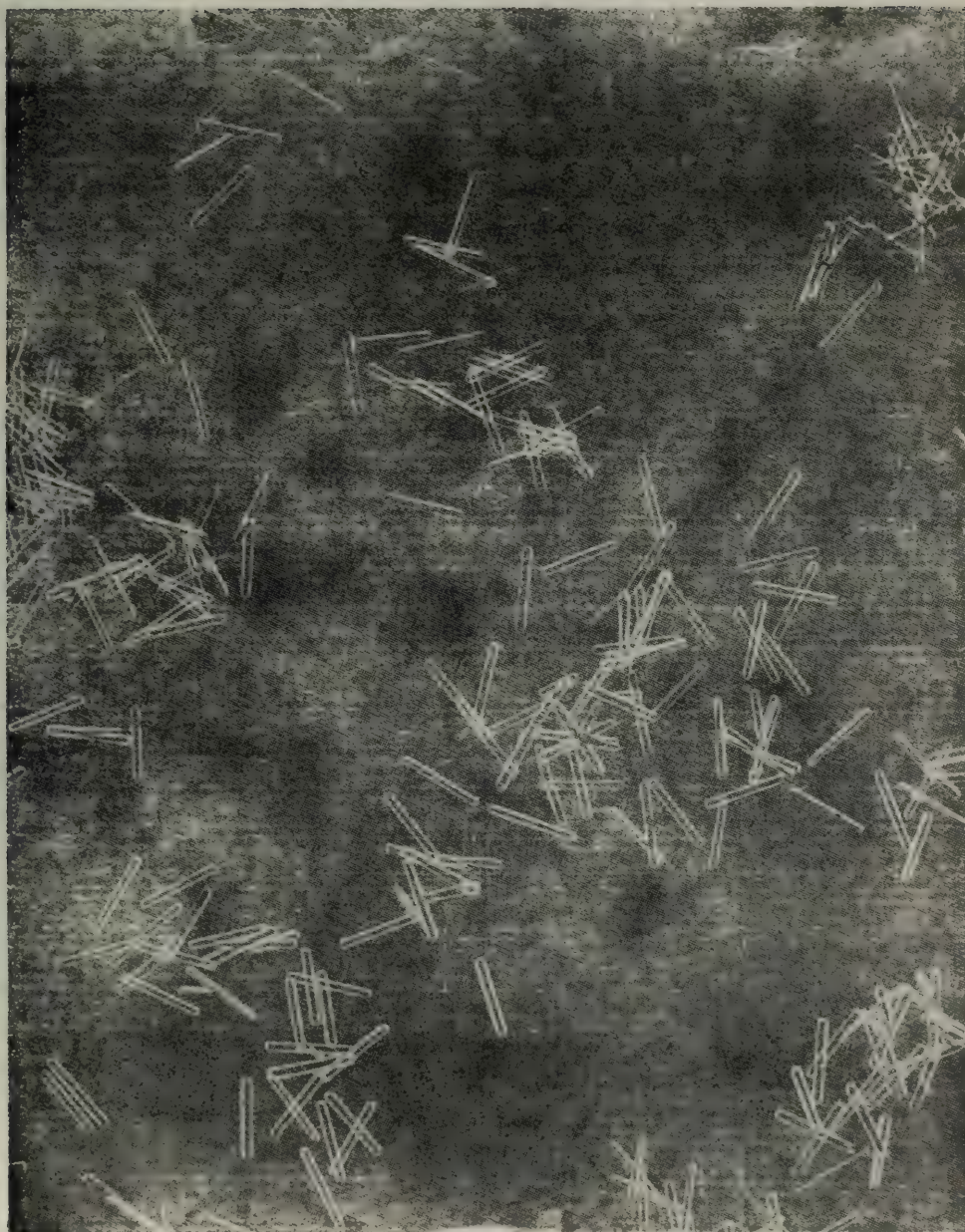
在这个定向考察中，我们简要叙述了今天生物化学的中心的和最基本的目标，那就是详尽地确定活细胞的分子逻辑。然而这不是生物化学唯一的目标，甚至不是最后的目标。细胞的生物化学，即这本书的主题，不过是很多其它生物学课题的分子水平研究的起点。最基本的目标，也许是去推论，在地球那还不很清楚的早期历史阶段，某些无生命的有机化合物最初是如何互相“发现”的，如何“学会”互相作用的，以及它们自己如何终于组织起来成为第一个“活”结构的。另一个目标是阐明原始细胞怎样通过进化发展成为今天我们周围外界非常齐全的植物和动物种类。还有一个目标是在分子水平上描述组织内细胞的相互作用和特殊机能，如肌肉收缩。更进一步的目标是神经机能的生物化学分析，从简单的细胞间联系的水平开始，上升到整合机能、到记忆、到行为以及最后到思维——真正包括人们为了认识自己的本质而提出的一切深刻的问题。在研究这些基本问题的同时，生物化学也在不断增加对人类的疾病及防治、对植物与农业，以及对生物界的生态学平衡的观察。

当我们开始研究生物化学时，构成细胞的分子逻辑的这些组织原则将作为我们参考的大纲。这本书将从叙述各类生物分子开始（第一篇），然后着手分析等温的、自我调整的、循序连接的酶促反应，这些反应组成了能量和物质转换的开放系统，即代谢过程。如我们已经看到的，新陈代谢包括两个反应网。以 ATP 的形式提供化学能的整个反应网将是第二篇的课题。另一个利用 ATP 进行细胞内的生物合成或作功的大反应网将在第三篇中详述。最后在第四篇中，我们将讨论细胞自我复制、细胞组分装配的分子基础。本书最终仍将归结到生命的起源及其分子逻辑。

【周衍椒译 任邦哲校】



## 第 I 篇 细胞的分子组成



牛胰蛋白酶结晶

# 第一章 生物分子与细胞

本章是一系列专门介绍几类主要生物分子的结构和性质的各章节中的第一部分,在这一章将要说明一个概念,即应当用两种观点来研究生物分子。当然,必须借经典化学中所使用的原理和手段,如研究非生物分子那样来研究生物分子的结构和性质。但是还必须根据这样一种假说的指导进行研究,这种假说认为生物分子是进化选择的结果,并且它们可能是完成其生物学功能的最适宜的分子,同时它们以一种称之为生命状态的分子逻辑的特定关系而彼此相互作用。此外,还必须考虑到生物分子的大小和形状,正如以后将要述及那样,生物分子的大小和形状不仅决定生物的相互作用的特异性,而且还决定活细胞及其组成的细胞器的大小和超微结构。

## 有机化合物的生物适宜性

某些化学元素似较其它元素更“适合”组成活机体的分子,因为在地壳上 90 种天然化学元素中,只有 27 种是各种活机体所必需的组分(表 1-1)。然而,在活机体中化学元素的分布并不同于它们在地壳中出现的比例(表 1-2)。地壳中最丰富的四种元素是氧、硅、铝和铁,而活机体中含量最多的四种元素却是氢、氧、碳和氮,多数细胞的质量约 99% 是由它们组成的。因此可以设想,这四种元素的化合物在共同构成生命的过程中具有值得注意的分子适宜性。

表 1-1 生物元素

下列元素是一种或多种机体在营养上所必需的,但并非对每一品种都是必需的

有机物的元素	微量元素
氧 O	锰 Mn
碳 C	铁 Fe
氮 N	钴 Co
氢 H	铜 Cu
磷 P	锌 Zn
硫 S	硼 B
单原子的离子	铝 Al
钠 Na <sup>+</sup>	钒 V
钾 K <sup>+</sup>	钼 Mo
镁 Mg <sup>2+</sup>	碘 I
钙 Ca <sup>2+</sup>	硅 Si
氯 Cl <sup>-</sup>	锡 Sn
	镍 Ni
	铬 Cr
	氟 F
	硒 Se



碳、氢、氮和氧具有一共同的性质：它们容易借共用电子对形成共价键。为满足其外壳电子，氢需要一个电子，氧需要二个，氮需要三个，碳需要四个，这样便能形成稳定的共价键。这四种元素彼此反应，形成许多不同的共价化合物。而且其中碳、氮、氧三元素能共用一个或两个电子对以形成单键或双键，这种特性使它们具有相当广泛的化学结合方式。碳、氮、氢和氧还有另外一种“适宜性”，即它们是能形成共价键的最轻元素。然而，由于共价键的强度与键合原子的原子量呈反比，所以这四种元素能形成最稳定的共价键。

表 1-2 地壳与人体中主要化学元素的相对含量，即占原子总数的百分数

地 壳	人 体
氧 O 47	氢 H 63
矽 Si 28	氧 O 25.5
铝 Al 7.9	碳 C 9.4
铁 Fe 4.5	氮 N 1.4
钙 Ca 3.5	钙 Ca 0.31
钠 Na 2.5	磷 P 0.22
钾 K 2.5	氯 Cl 0.08
镁 Mg 2.2	钾 K 0.06
钛 Ti 0.46	硫 S 0.05
氢 H 0.22	钠 Na 0.03
碳 C 0.19	镁 Mg 0.01

碳原子具有另一个极重要的特性，即它具有彼此结合的能力。因为碳原子既可接受，也可供给四个电子来满足其外层八个电子，它能与另外四个碳原子形成共价键。按照这种方式，共价连接的碳原子就可以构成无数不同种类的有机分子的线性或分枝状或环状的骨架。此外，由于碳原子也能与氧、氢、氮及硫等形成共价键，许多不同种类的功能基就可结合到有机分子的结构中去。

碳的有机化合物还有另一显著特征，那就是由于围绕每个单键结合的碳原子的电子对具四面体构型，借碳-碳键可以得到许多不同的三维空间结构。没有其它化学元素能够形成如此大不相同的大小和形状，或这么多类型的功能基团。

## 细胞的分子组织系统

活机体的生物分子排列成分子复杂性不断增加的系统，如图 1-1 所示。归根到底，全部有机生物分子都是来自从环境中获得的非常简单的、分子量低的前体，特别是  $\text{CO}_2$ 、 $\text{H}_2\text{O}$  和大气氮。这些前体都是由生命物质经过一系列代谢中间产物转变成结构单位的生物分子，即分子量稍大的有机化合物。然后，这些基本单位分子彼此共价连接形成细胞中分子量较大的分子。因此，氨基酸是蛋白质的结构单位，核苷酸是核酸的结构单位，单糖是多糖的结构单位，而脂肪酸则是绝大多数脂类的结构单位。[虽然与蛋白质、核酸及多糖比较单个脂肪的分子量是较低的（分子量 750—1,500），然而某些脂肪能自发地结合至粒子重量大的结构中去，并常起着大分子体系的作用。为了目前说明的需要，我们随意地将它归属大分子。]

在再高级水平的细胞组织中，不同类型的大分子彼此缔合，形成超分子系统，譬如，

细胞器	细胞
	核
	线粒体
	叶绿体
	高尔基体
超分子装置 (粒子量 $10^4-10^6$ )	核糖体
	酶复合物
	收缩系统
	微管
大分子 (分子量 $10^3-10^6$ )	核酸
	蛋白质
	多糖
	脂类
结构单位 (分子量 100-350)	核苷酸
	氨基酸
	单糖
	脂肪酸
	甘油
代谢中间产物 (分子量 50-250)	丙酮酸盐
	柠檬酸盐
	苹果酸盐
	3-磷酸甘油醛
来自环境的前体 (分子量 18-44)	二氧化碳
	水
	氨
	氮

图 1-1 细胞的分子组织系统

脂蛋白是脂类和蛋白质的复合物;核糖体则是核酸和蛋白质的复合物。例如,细菌细胞的核糖体含有 3 个不同的核糖核酸分子和大约 50 个不同的蛋白质分子。然而,这些组分在这里装配的方式都明显不同。在超分子复合物中,大分子组分不是通过共价彼此结合。核糖体中核酸与蛋白质组分就是通过比较微弱的非共价键力而结合的,如氢键、疏水作用以及 van der Waals 作用等。可是,因为它们是通过大量微弱缔合力结合起来,在生物学的条件下,像核糖体这种超分子复合物是极其稳定的。然而,大分子以非共价结合形成超分子复合物也是非常特异的,这是由于在各组成部分间存在着精确的几何空间结构的“适合”或者互补的结果。例如,后面将会讨论到(三十三章),核糖体的三维结构具有高度的次序和特异性,这与核糖体能将遗传信息翻译成蛋白质结构的复杂功能是符合的。

最后,在细胞结构系统中,最高组织水平是各种超分子复合物进一步装配成细胞器——细胞核、线粒体和叶绿体,以及其它细胞内结构和包涵物(如溶酶体、微粒体及液泡)。就目前所知,这里各种大分子和超分子组分也都是通过非共价键的作用结合起来的。

表 1-3 列出普通细菌(大肠杆菌)中几类主要生物分子的相对含量。蛋白质(希腊文 proteios, 即“首要”)是细胞中含量最多的大分子,构成细胞干重的 50% 以上。大肠杆菌细胞可含有 3,000 种以上不同种类的蛋白质分子。大肠杆菌中含量第二多的大分子是核酸,其次就是糖类与脂类。如果不考虑活机体那些相对惰性的部分,如外骨骼、骨的矿物



质部分、细胞外物质如毛发或羽毛，以及细胞内的贮存物质如淀粉和脂肪，它们在各种细胞或有机体中的含量彼此的差异很大，实际上，所有活细胞中几类主要生物分子的含量与大肠杆菌细胞所含的比例大致相同。因此，各种类型细胞的“有生命”部分具有大致相同的大分子组成。

表 1-3 大肠杆菌细胞中主要的分子组分

组 分	总量的百分率	分子种类的概数
水	70	1
蛋白质	15	3,000
核酸		
DNA	1	1
RNA	6	1,000
糖类	3	50
脂类	2	40
基本单位分子与中间产物	2	500
无机离子	1	12

在所有各类型的细胞中几类主要的生物分子担负着相同的功能。核酸普遍地起贮存与传递遗传信息的作用。在所有细胞中，蛋白质是基因作用的直接产物和效应物。有些蛋白质具有特异的催化活性和功能，譬如酶，而另外一些蛋白质则可作为结构的成分。蛋白质是最有用的一类大分子，这就是为什么本书专门介绍有关生物分子的结构与性质的十三章中，就以七章来介绍蛋白质。在所有细胞中多糖有两个主要的功能：有些多糖，如

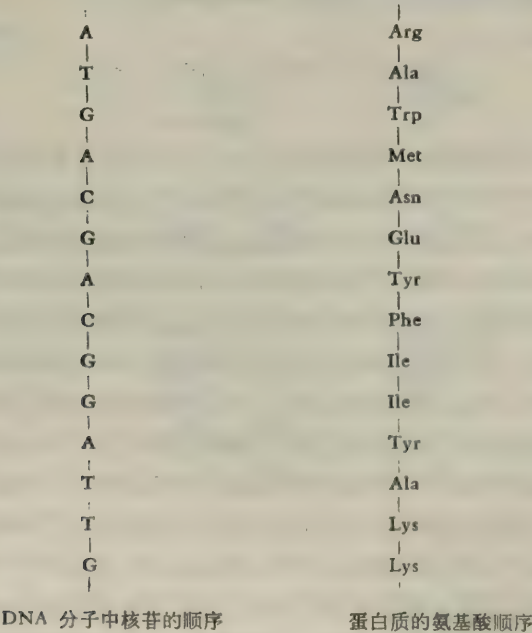


图 1-2 细胞的信息大分子

字母 A、T、G、C 分别表示 DNA 的四个核苷结构单位。构成蛋白质的结构单位——氨基酸，用它们英文的三个字母来表示，如精氨酸（Arg）、丙氨酸（Ala）、色氨酸（Trp）等。

淀粉,可作为细胞活动所需的产能燃料的贮存形式,而另一些多糖,如纤维素,则是细胞外结构的成分。在所有细胞中,脂类也具有同样的作用:既可作为膜的主要结构组分,又是高能燃料的贮存形式。

另一点须要说明。核酸、蛋白质和多糖、脂类之间有一个重要的和根本的区别(图1-2)。核酸和蛋白质都是信息大分子。每个核酸分子含有四种或更多的核苷酸,按特定的富于信息的顺序排列着。同样,每种蛋白质分子也是由大约二十种不同氨基酸组成一种特定的、富于信息的顺序。但是多糖与脂类却没有携带信息的功能。例如,多糖中重复出现的结构单位既可以全部相同,如淀粉就是葡萄糖的多聚体,也可以是由结构单位组分有规则地交替出现而组成的。

## 原始的生物分子

表1-3显示,在大肠杆菌细胞中,大约有3,000种不同的蛋白质与1,000种核酸。各种不同的蛋白质都只由20种不同的氨基酸所组成,而核酸大都只由8种不同的核苷酸组成。同样大肠杆菌的多糖只由少数简单的糖分子组成。因为所有活机体的大分子都只由相当少数的几种简单的结构单位分子所组成,所以认为地球上出现的第一代细胞可能仅仅从20—30种不同的有机分子建造成的(图1-3)。这一组原始生物分子可能包括20种氨基酸,5种含氮的碱,一种或多种脂肪酸,两种糖,一种醇——甘油,和一种胺——胆碱。不论它们的精确数目是多少或是相同,这一组原始生物分子可认为是所有其他生物分子的祖先;它们是生命物质的开始。因为在它们之间存在着一种不寻常的和独特的关系。所以这类简单的有机物质使我们不得不感到惊奇。

## 生物分子的专门化与分化

当活机体发展为更高度分化和复杂的形式时,可以认为那些具有更复杂和多变的新生物分子是由原始生物分子演化而来的。例如,目前已知在生物界存在的不同氨基酸达150种以上,但几乎全部是从构成蛋白质的20种基本氨基酸衍生出来的。同样,已知有数十种不同的核苷酸和核苷酸衍生物也全都含有五种原始含氮碱的“后代”。在生物中已有70种以上的单糖都是从葡萄糖衍生来的,而且在不同的生物体内,又从这些单糖形成了大量不同的多糖。许多种不同的脂肪酸也都是从一种或几种原始的脂肪酸衍生而来的。现将从原始生物分子演化形成专门的“子代”的某些例子列于表1-4。

许多专门化了的生物分子是极端复杂的,初看起来,似乎与30种原始生物分子很少相似之处。其中有各种色素、带香气的香精油、激素、抗菌素、生物碱,以及各种结构分子,如木材的木质素等。然而近来对这类复杂物质的生物起源的研究表明,最终它们也都是从原始生物分子中的一种衍生出来的。例如,萜类是一大类生物分子,包括某些维生素、多种香精油、植物色素,以及如橡胶这样复杂的天然产物,最终也全是由乙酸建造的,而乙酸又是葡萄糖与脂肪酸的主要裂解产物。已知有数百种不同的生物碱,其大多数都是由氨基酸衍生出来的。因此,原始生物分子是目前在各种活机体中发现的大量不同的有机化合物的生物学“祖先”。





表 1-4 某些原始生物分子演化生成的一些专门的衍生物

精氨酸	鸟嘌呤	棕榈酸
鸟氨酸	1-甲基鸟嘌呤	油酸
瓜氨酸	2-甲基鸟嘌呤	硬脂酸
脯氨酸	2-二甲基鸟嘌呤	月桂酸
3-羟基脯氨酸	2-O-甲基鸟嘌呤	棕榈油酸
4-羟基脯氨酸	7-甲基鸟嘌呤	棕榈醛
4-羟甲基脯氨酸	D-葡萄糖	硬脂醛
4-亚甲基脯氨酸	D-甘露糖	
4-酮脯氨酸	D-果糖	
亮氨酸	D-半乳糖	
$\beta$ -羟基亮氨酸	N-乙酰氨基葡萄糖	
$\delta$ -羟基亮氨酸	D-葡萄糖醛酸	
$\gamma, \delta$ -羟基亮氨酸	6-磷酸-D-葡萄糖	
$\gamma$ -羟基亮氨酸	抗坏血酸	
N-甲基亮氨酸	肌醇	
	蔗糖	
	麦芽糖	
	乳糖	

## 生物分子的起源

除在生命物质中存在着生物分子外,在地壳内仅只含有微量的有机化合物。那么,第一个活机体又是怎样获得其特殊的有机的结构单位——原始生物分子的呢?

近代研究揭示,在地球史的早期,有许多不同的有机化合物以较高浓度出现于海洋的表层水中。不知道什么原因使第一个活细胞就从这种含有机化合物的温“肉汤”中产生出来了(见三十七章)。现在一般认为,地球的年龄大约有 48 亿 ( $4.8 \times 10^9$ ) 年。活机体可能早在 40 亿年以前就出现了。类似于现今已知的细菌的化石遗迹的年代也确信至少有 33 亿年了。

在廿世纪二十年代,苏联的一位生物学家奥巴林曾提出,自然界的化学和物理过程能导致从甲烷、氨及水蒸汽自发形成一些简单的有机化合物,例如氨基酸和糖。他曾设想甲烷、氨及水蒸汽可能是原始大气的成分。根据他的学说,这些气体是被太阳光的辐射能或闪电时的放电所激活而相互作用的。这样形成的简单的有机化合物凝结并溶解于原始的海洋中,于是海洋逐渐充实了大量不同的有机化合物。奥巴林还设想,第一个活细胞就是自发地起源于这样一种温热的含有机化合物的浓缩溶液中,英国的 J. B. S. Haldane 独立地提出过这一观点。这些观点曾引起了许多争论,但是它一直以一未经验证的假说保留达二十多年之久。

目前已知原始大气中存在的气体成分能够成为有机化合物的前体,这一观点现在已得到实验室研究的充分证明。关于有机分子非生物起源的早期实验中有 Stanley Miller 在 1953 年进行的那些工作。他将当时认为占原始大气中主要成分的甲烷、氨、水和氢的混合气体放入一个 80℃ 的密闭烧瓶中,通过一对电极放电以模拟闪电,这样连续一周或更长的时间(图 1-4)。然后,他收集并分析了这个系统的成分。发现气相中含有一氧化碳、



二氧化碳和氮，这些显然是由最初放入瓶内的气体生成的。在冷却了的、深色的冷凝物中，他还发现可观数量的水溶性有机物质，他用层析法进行了分离。经 Miller 鉴定的化合物中有若干种  $\alpha$ -氨基酸，包括已知蛋白质中的某些氨基酸，如甘氨酸、丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸。他还发现已知活机体内的几种简单的有机酸，如甲酸、乙酸、丙酸、乳酸和琥珀酸等。（表 1-5）

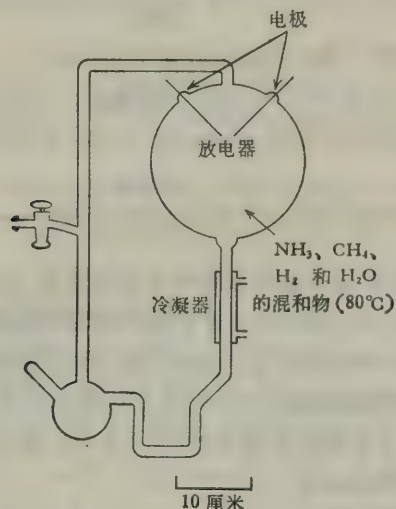


图 1-4 在原始大气条件下进行非生物源有机化合物形成的示范性火花放电仪

表 1-5 模拟原始大气条件下火花放电所生成的某些有机化合物<sup>†</sup>

甘氨酸	天冬氨酸	羟基乙酸
丙氨酸	谷氨酸	乳酸
N-甲基甘氨酸	亚氨基二乙酸	$\alpha$ -羟丁酸
$\beta$ -丙氨酸	亚氨基乙基丙酸	琥珀酸
$\alpha$ -氨基丁酸	甲酸	尿素
N-甲基丙氨酸	乙酸	甲脒

<sup>†</sup>发现了许多其它物质：见三十七章。

Miller 设想在这些实验中生成的各种有机化合物是像表 1-6 中所列的反应顺序那样发生的。他提出由甲烷和氨可形成氰化氢，并且放电也使甲烷转变成乙烯和其他烃类。氰化氢又能与乙烯反应产生一种腈[反应(2)]。然后腈再水解变成丙酸[反应(3)]。同样， $\alpha$ -羟基腈能与氨反应形成  $\alpha$ -氨基腈[反应(4)]。 $\alpha$ -氨基腈水解能生成  $\alpha$ -氨基酸，如丙氨酸[反应(5)]。

Miller 的这些实验，是在富于还原性的化合物——甲烷和氨的系统中进行的。但后来的实验是用含有氮、氢、一氧化碳和二氧化碳（但无甲烷或氨）的混合气体进行辐射能处理，也能形成氨基酸和其他有机分子，这就表明像氨及甲烷这样高度还原的前体，对于有机分子的非生物源形成并不是必需的。

各种不同形式的能量或辐射，包括可见光、紫外线、X 射线、 $\gamma$  射线、火花放电及静电放电、超声波、冲击波，以及  $\alpha$  与  $\beta$  粒子等，都可导致从上述这样简单的气体混合物形成有

表 1-6 在火花放电中的化学反应

$\text{CH}_4 + \text{NH}_3 \longrightarrow \text{HCN} + 3\text{H}_2$	(1)
$\text{C}_2\text{H}_4 + \text{HCN} \longrightarrow \text{CH}_3\text{CH}_2\text{CN}$	(2)
一种腈	
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CN} + 2\text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOH} + \text{NH}_3$	(3)
丙酸	
$\text{CH}_3\text{CHOHCN} + \text{NH}_3 \longrightarrow \text{CH}_3\text{CHNH}_2\text{CN} + \text{H}_2\text{O}$	(4)
一种氨基腈	
$\text{CH}_3\text{CHNH}_2\text{CN} + 2\text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{CH}_3\text{CHNH}_2\text{COOH} + \text{NH}_3$	(5)
丙氨酸	

机化合物。在这样的实验中,已发现可生成数百种不同的有机化合物,包括在细胞中发现的所有重要分子类型的代表,以及在细胞中尚未发现的许多化合物。在这种原始地球模拟实验的产物中,已经鉴定有蛋白质中所有常见的氨基酸,作为核酸结构单位的含氮碱——腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶、尿嘧啶和胸嘧啶,以及存在于生物界的许多有机酸和糖类等。似乎很可能原始海洋中确实很富于溶解的有机化合物,其中可能包括了我们今天在活细胞中所见到的许多或全部基本的结构单位分子。

## 生物分子的适宜性

为什么活机体只挑选了它们现在有的那些特殊种类的有机分子呢?为什么 20 种  $\alpha$ -氨基酸是构成所有生物中全部蛋白质的结构单位呢?而不只是 10 种,也不是 40 种呢?为什么他们都是  $\alpha$ -氨基酸呢?难道我们不能同样从氨基在  $\beta$  位置上的氨基酸来建造大“蛋白质”分子吗?为什么从几十种已知的嘌呤与嘧啶衍生物中只挑选了腺嘌呤和鸟嘌呤,以及胞嘧啶和胸嘧啶,来作为所有各种生物中 DNA 的主要结构单位呢?大量的证据支持这一概念,即今天我们已知的生物分子是从极其大量可利用的有机化合物中挑选出来的。事实上,在上述那些有机分子非生物起源的模拟原始地球实验中,已分离出几百种不同的有机化合物。因为形成能够生存的最早的生物结构可能只需要少数不同的有机化合物,看来很可能有一种自然选择的过程。

下面的事实是构成关于适宜性概念的另一个证据,这就是生物界出现有 150 种以上不同的氨基酸,但是所有生物种属的全部蛋白质都是由同一组 20 种原始氨基酸所建造成的。如果任何一种其它的氨基酸比原始氨基酸更“适宜”于作为蛋白质分子的组分,那么应当有充分的进化时间让活机体获得利用它们的能力。

## 生物分子的大小和形状

在第一部分中,我们介绍几类主要生物分子的结构和性质,当我们介绍这些时,我们也必须特别注意每一种生物分子的大小和形状。因为这些属性在生物化学和分子生物学



中有着重大的意义。我们在前言中已介绍了底物与一种酶的活性部位之间的互补是这样的精确适宜,以致使酶促催化作用具有很高的效率和选择性,而没有副产物。如果底物分子的关键部位的大小只要有很小的改变,底物分子可能就不再适合于酶的活性部位了,因此就不能被酶作用。而且复制 DNA 的遗传讯息的很大的准确性,也取决于特定的生物分子之间彼此能否精确地适合。因此不仅需要掌握生物分子的大小与形状,而且还要掌握它们与各种细胞内结构大小的关系。表 1-7 列举了常用以表示分子与细胞大小的质量和长度的单位。

表 1-7 质量和长度的某些单位

质量:	
1 道尔顿 (dalton)	= 一个氢原子的质量 = $1.67 \times 10^{-24}$ 克
1 微微克 (picogram)	= $1 \times 10^{-12}$ 克
长度:	
1 毫微米 (nm)	= $10^{-9}$ 米 = 10 埃 (Å)
1 微米 (μm)	= $10^{-6}$ 米 = 1,000 毫微米 (nm) = 10,000 埃 (Å)

以前,分子的大小以埃 (Å) 为单位,细胞大小用微米 (μ) 作单位,而波长是以毫微米 (mμ) 为单位,1 微米 (μ) =  $10^{-3}$  毫米 (mm)。但是,现在则推荐国际上公认的米制单位:毫微米 (nm),微米 (μm) 及毫米 (mm)。因此,本书将用毫微米 (nm) 表示光的波长及分子大小,而用毫微米 (nm) 或微米 (μm) 表示细胞的大小。

表 1-8 显示适用于表示米制系统 10 的幂的标准前缀。为了方便起见在附录中又重复表列这些前缀,国际单位系统 (SI) 的其它缩写字也都列入附录表中。

表 1-8 国际单位系统 (SI) 所用单位的 10 的幂†

数 值	前 缀	缩 写
$10^6$	mega (兆)	M
$10^3$	kilo (千)	k
$10^{-1}$	deci (分)	d
$10^{-2}$	centi (厘)	c
$10^{-3}$	milli (毫)	m
$10^{-6}$	micro (微)	μ
$10^{-9}$	nano (毫微)	n
$10^{-12}$	pico (微微)	p
$10^{-15}$	femto (尘)	f
$10^{-18}$	atto (渺)	a

† 因不允许再用前缀的组合,所以用 n-代替 mμ, 而以 p 代替 μμ-

在印刷的纸页上,只能用平面的两维投影表示有机分子的结构,但这样远不足以描述生物分子真正的三维构型。由于这个原因,在遇到有关分子特异性问题时,生物化学家总是创造一些生物分子的三维模型。已有两类分子模型(图 1-5):晶体学模型能表示具有正确的键角与键长的共价骨架,但是这种模型不能表示分子所占有的真实空间。另一方面,实体模型(图 1-5 和 1-6)则不易表示主链中的键角和距离的细节,但它却能显示分子的

范德瓦耳斯外形或表面。虽然这两种模型都可用来研究生物分子的结构，但正是实体模型才能如实地代表分子，如同分子能被细胞或其特异成分之一（譬如某种酶）“识别”一样。实际上，酶远不止能“识别”其底物的三维形状。它能“识别”底物电荷的位置和符号，以及带电荷的基团之间的精确距离。它还能“识别”不带电荷的极性基团，如羟基、羰基与酰胺

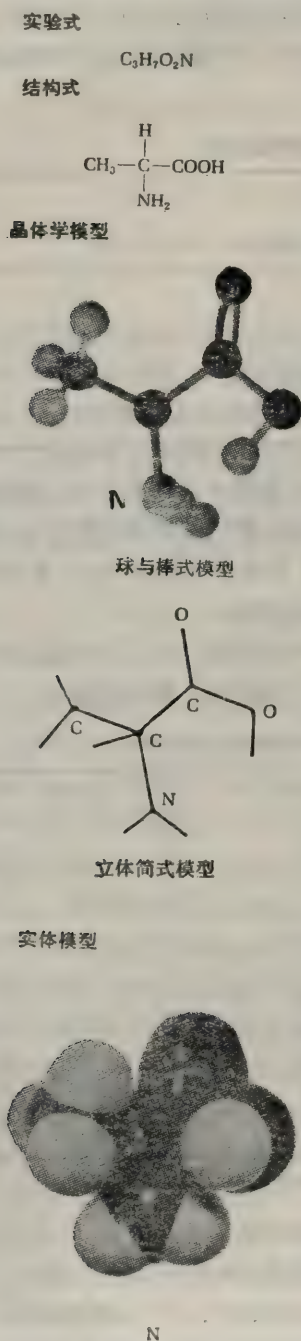


图 1-5 丙氨酸未离解形式的结构的不同表示方法和模型

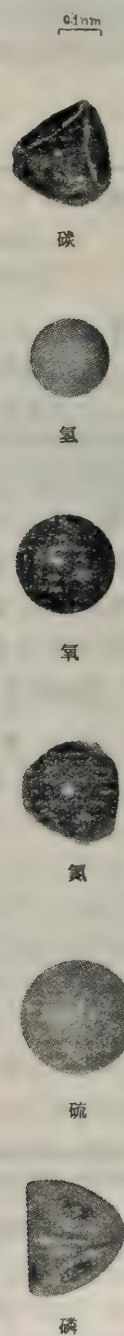


图 1-6 某些生物学上重要原子的实体模型(按尺寸)



基等的位置,而这些基团有可能参与氢键的形成。它也能“识别”位于生物分子表面的非极性或烃区的大小及形状,而这些非极性区或烃区能为其它分子提供重要的接触面。

三维形状和表面外形对大分子来说是十分重要的。在正常细胞内的条件下,蛋白质只有一种特征性的三维构象,称为天然构象,只有这种构象才是其生物学活性所不可缺少的。例如,只当酶分子具天然构象时才有催化活性。然而我们不易从印刷纸面上的两维结构推测出大分子的三维构象;我们也不能用通常的实体原子模型准确无误地复制三维构象。为确定生物大分子的精确构象,需要用复杂的物理方法,特别是X射线衍射分析法。其实,用X射线分析以图示大分子的三维结构,以及研究其结构与生物学活性的关系,是生物化学及分子生物学的主要研究目的。

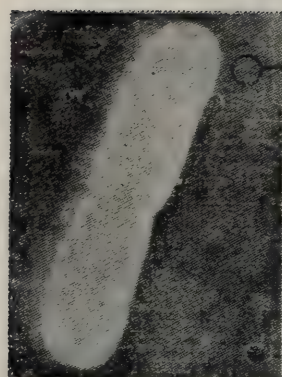
### 生物分子、超分子结构与细胞器

生物分子的大小与形状还具有另一方面有决定性的重要意义。我们已经知道,在活细胞中有一种分子组织的系统(图 1-1);简单的生物分子是大分子的结构单位,大分子是超分子复合物的成分,超分子复合物又装配成细胞器,细胞器和其它的结构则组成细胞。显然,作为简单的结构单位的生物分子的大小、形状以及其物理特性必然决定大分子的大小和性质,大分子的形状及表面外形本身又决定大分子如何配合以形成超分子结构,而超分子结构又决定细胞器的结构,最终也决定了细胞本身。

较小的结构单位生物分子的大小、形状及性质如何影响整个细胞的大小、形状及生物学行为呢?关于这方面引人注意的例子是一种人类遗传性疾病——镰状细胞贫血。患这种疾病的病人的红细胞,除了携氧的蛋白质——血红蛋白外,它具有正常的生物化学组成。血红蛋白是由约 600 个氨基酸连接成 4 条多肽链所构成的。由于遗传突变:正常血红蛋白的两分子谷氨酸在镰状细胞的血红蛋白中被两分子缬氨酸所取代,这种病人的血红蛋白分子与正常血红蛋白的成分产生了很小的差异。这种差异仅仅影响约 600 个氨基

表 1-9 某些生物分子与细胞组分的大小和重量的近似值

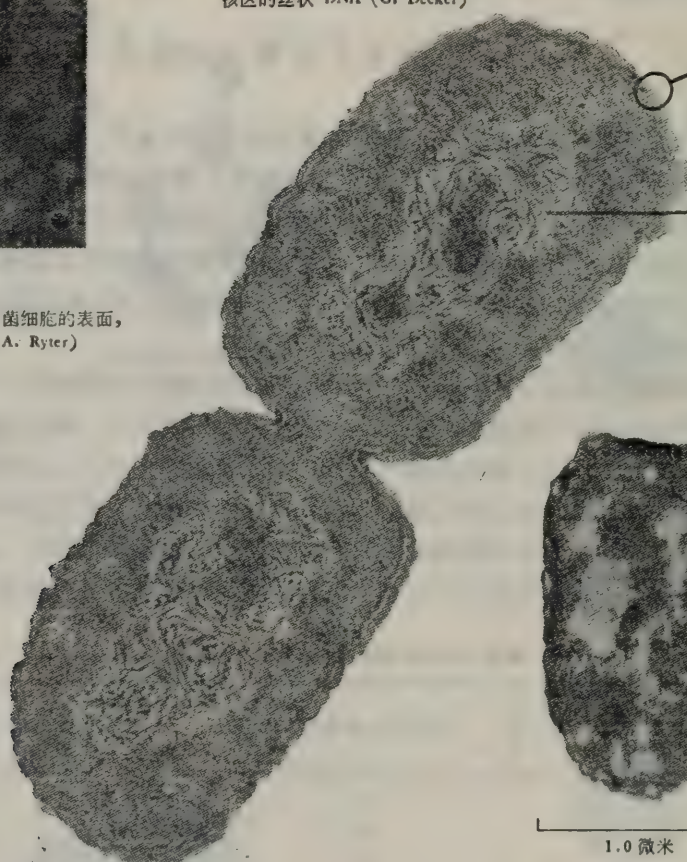
	长度大小,毫微米	重 量	
		道 尔 顿	微微克 (pg)
丙氨酸	0.5	89	
葡萄糖	0.7	180	
磷脂	3.5	750	
肌红蛋白(一种小蛋白质)	3.6	16,900	
血红蛋白(一种中等大小的球蛋白)	6.8	65,000	
肌球蛋白(一种大棒状蛋白质)	160	470,000	
大肠杆菌的核糖体	18	2,800,000	
大肠杆菌的噬菌体 $\phi$ X 174	25	6,200,000	
烟草斑纹病毒(杆状)	300	40,000,000	$6.68 \times 10^{-4}$
线粒体(肝细胞)	1,500		1.5
大肠杆菌细胞	2,000		2
叶绿体(菠菜叶)	8,000		60
肝细胞	20,000		8,000



正在分裂的大肠杆菌细胞染色  
以显示细胞壁和细胞膜，以及组成  
核区的丝状 DNA (G. Decker)

1.0 微米

正在分裂之大肠杆菌细胞的表面，  
染色以显示大量纤毛 (A. Ryter)



0.5 微米

1.0 微米

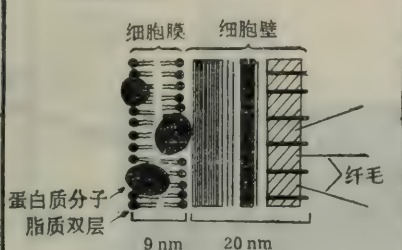

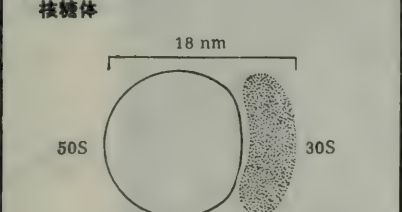
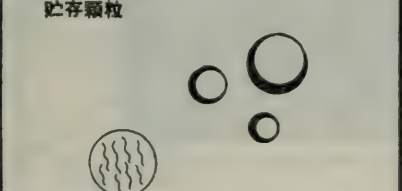

大肠杆菌细胞染色  
以显出核糖体 (L. D. Simon)

图 1-7 原核细胞的结构组织

原核生物是一类很小的，只具有单层膜即细胞膜的较简单的细胞，细胞膜通常被一层坚硬的细胞壁包围着。因为它们没有其它膜，所以它们没有胞核，也没有膜性细胞器，如线粒体或内质网。原核生物包括真菌、蓝藻、螺旋体、立克氏体和枝原菌或类胸膜肺炎菌。它们只含有一条染色体，这条染色体由一个双螺旋 DNA 分子所组成。它紧密地盘绕形成核区。原核生物通过无性分裂可大量繁殖。原核生物是生物进化中产生的第一代细胞。

大肠杆菌的电子显微镜照片。这种需氧细菌是从人体肠道内所发现的大肠杆菌型菌类中最典型的一种。其成熟细胞是一个长约 2 微米，直径 1 微米的圆柱形棒；重量约 2 微微克。在含有葡萄糖作为碳来源和铵离子作为氮来源的简单的培养基里，大肠杆菌能迅速繁殖：在 37°C 时，其分裂时间可短到只有 20 分钟。我们对遗传的分子基础的大部分知识，都是来自对大肠杆菌的各种菌株和变种，以及大肠杆菌噬菌体的研究而获得的。显然，有关大肠杆菌的生物化学和遗传学的了解比任何其它细胞都要多，但是距离能进行完全的分子描述还很远。



示意图	分子组成	性质与功能
<p>细胞壁和膜</p> 	<p>细胞壁含有一与短肽链交联的多糖链组成的坚硬骨架。其外层表面裹有一层脂多糖。纤毛不是在所有细菌中都能见到,这种纤毛是细胞壁的延伸物。</p> <p>细胞膜大约含有 45% 的脂类和 55% 的蛋白质;细胞膜的褶入部分称为中介体 (mesosome)。</p>	<p>细胞壁使细菌在低渗介质中免于肿胀。这种壁具有多孔性,而且能让多数小分子通过。有些纤毛是空心的,而且在有性接合生殖时起传递 DNA 的作用。</p> <p>细胞膜是一种选择性通透的膜,能让水、某些营养物质,以及金属离子自由通过。担负着使营养物的能量转变为 ATP 的酶是位于膜内。</p>
<p>核区</p> 	<p>遗传物质是直径 2 微米,长约 1.2 毫米的双螺旋 DNA 紧密盘绕而成的一条染色体。</p>	<p>DNA 是遗传信息的载体,细胞分裂时,其每股都被复制产生两个子代双螺旋分子。遗传讯息是从一股 DNA 转录而形成信使 RNA (mRNA)。</p>
<p>核糖体</p> 	<p>大肠杆菌细胞含有大约 15,000 个核糖体。每个核糖体都有一个大的和一个小的亚基。每个亚基约含有 65% 的 RNA 和 35% 的蛋白质。</p>	<p>核糖体是蛋白质的合成部位。信使 RNA 结合在亚基之间的沟中,并且能确定正在合成多肽键的氨基酸顺序。</p>
<p>贮存颗粒</p> 	<p>大肠杆菌及许多其它细菌含有贮存颗粒即糖的多聚体。有些细菌含有多聚-β-羟基丁酸颗粒。</p>	<p>当需要用作燃料时,这些多聚体通过酶促反应降解成游离葡萄糖或游离的 β-羟基丁酸。</p>
<p>胞汁</p> 	<p>细胞质的可溶性部分是高粘度物质;其蛋白质浓度很高,可超过 20%。</p>	<p>胞汁中的大多数蛋白质是代谢所需要的酶类。胞汁也含有代谢中间产物和无机盐类。</p>

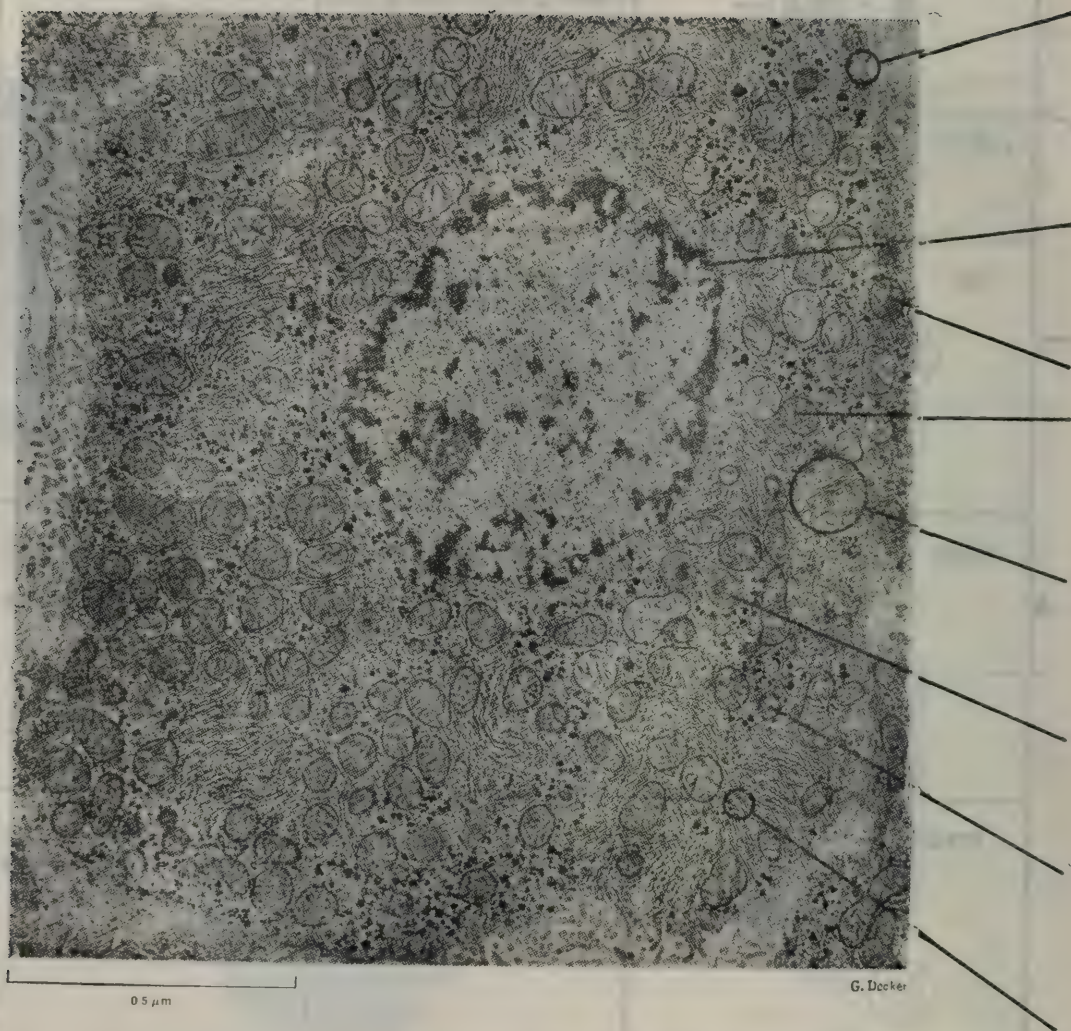


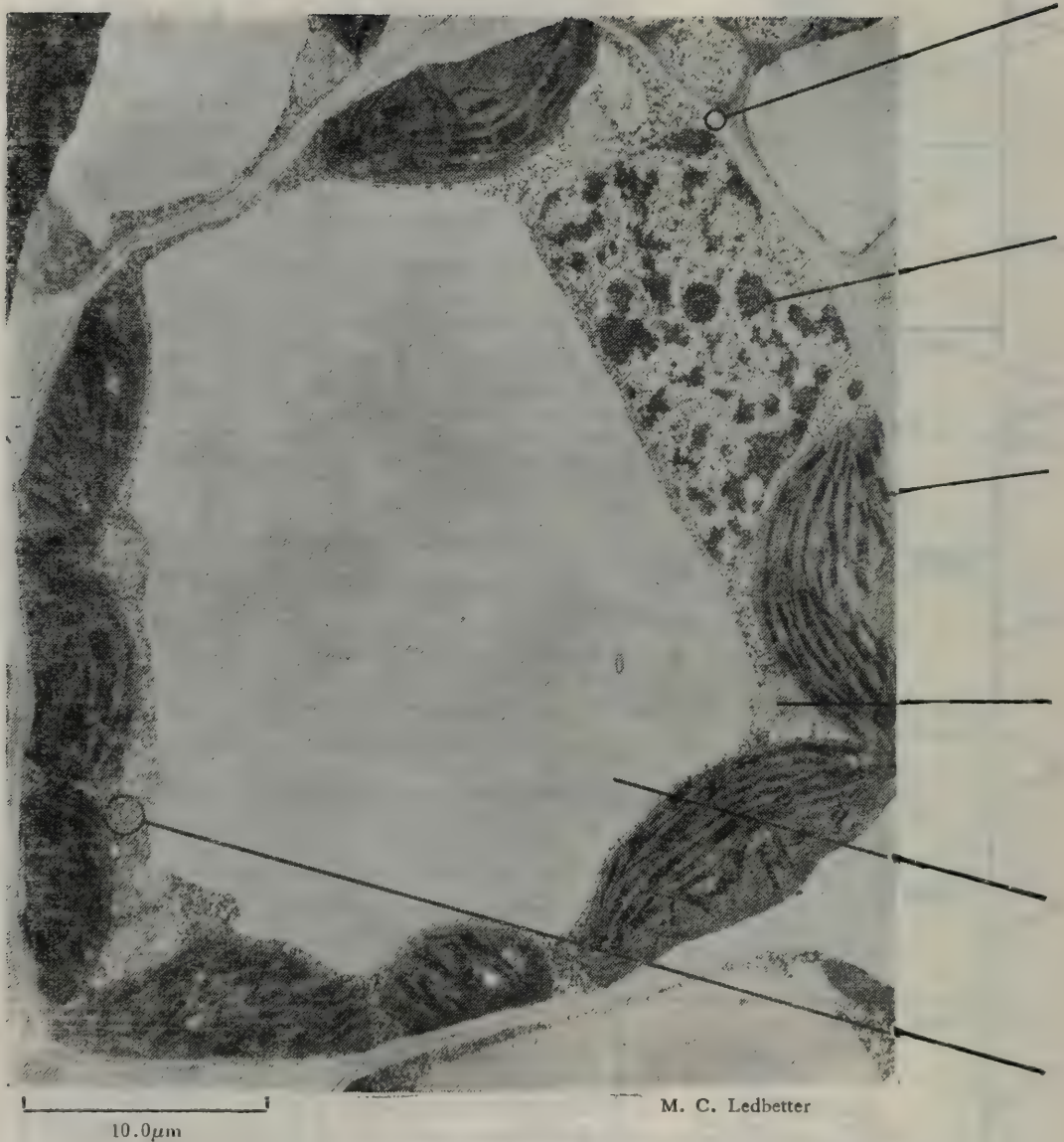
图 1-8 真核细胞的结构组织

真核细胞比原核细胞大得多,也复杂得多。大多数真核生物细胞的体积比典型的原核生物大 1,000—10,000 倍。所有高等植物与高等动物界的细胞都是真核细胞,而且真菌、原生动物和大多数藻类也都是的。真核生物有一个被膜包围着的核。遗传物质分成几条或许多条染色体,细胞分裂时染色体则进行有丝分裂。此外,真核生物还有内膜,后者包绕着细胞器如线粒体、高尔基体以及内质网。它们的许多代谢反应都被分隔在各种结构的分室中进行。在进化起源上,真核生物比原核生物较近代一些,推测前者还是从后者演化出来的。

上图为一个用四氧化锇固定的大鼠肝细胞薄切片的电子显微镜照片。大鼠肝细胞呈多角形,其直径约 20 微米。在代谢上它们是具有多种功能的细胞,其最重要的功能是从肠道进入肝脏的食物分子进行生化加工和分配。它们以糖原形式贮存葡萄糖,制备含氮废物以排泄,以及合成血浆蛋白质和脂类。肝细胞能完成细胞的全部主要代谢活动。它们也许是研究得最透彻的动物细胞,因为肝细胞容易大量获得,在匀浆后用差示离心法,也能较容易地分段分离制备成胞核、线粒体、内质网(“微粒体部分”),以及其它亚细胞部分。



示意图	分子组成	性质与功能
<p><b>细胞膜</b></p>	<p>肝细胞的细胞外层是柔韧而粘滞的,它是由酸性粘多糖、脂类及糖蛋白所组成。</p> <p>质膜厚约9毫微米,含有等量的脂类和蛋白质;脂类排列成双层。它所含脂类的种类远比细菌的细胞膜多。</p>	<p>细胞外层的粘性具有特异性,并在细胞对细胞的识别上和在组织构成中都起重要的作用。</p> <p>质膜具有选择性通透性,它含有 <math>\text{Na}^+</math>、<math>\text{K}^+</math>、葡萄糖、氨基酸、其它营养物质,以及一些重要酶类的主动转运系统。</p>
<p><b>核</b></p>	<p>细胞核,直径约4—6微米,被一层核周包膜所包围。核内的DNA与组蛋白结合而组成染色体。核仁富含RNA。</p>	<p>当有丝分裂时,染色体通过其DNA的复制,并分裂成为子代染色体。</p>
<p><b>线粒体</b></p>	<p>每个肝细胞约有800个线粒体,呈球形,直径稍大于1微米,约占细胞质容积的20%。其外层和内层膜中的类脂组成与酶活性有所不同。基质富含酶类。</p>	<p>线粒体是细胞的能量站,在这里糖类、脂类、氨基酸类被分子氧氧化成 <math>\text{CO}_2</math> 和 <math>\text{H}_2\text{O}</math>,同时释放的能量转换成ATP的能量。电子转运与能量转换的酶类都位于内层膜上。</p>
<p><b>高尔基复合体</b></p>	<p>高尔基复合体由扁平的单层膜的泡囊组成,通常排列成堆。通过挤出过程定期在外周产生小泡囊。有些变成液泡,在液泡中分泌产物被浓缩。</p>	<p>高尔基器的功能在于将细胞产物如蛋白质等分泌到细胞外面,也有助于形成质膜及溶酶体膜。</p>
<p><b>微体(过氧化体)</b></p>	<p>微体是直径约0.5微米的单膜泡囊。微体含有过氧化氢酶、D-氨基酸氧化酶、尿酸氧化酶和其它氧化酶类,常常以晶体排列方式存在。</p>	<p>微体参预某些营养物质的氧化。过氧化氢,这些细胞器中氧的还原产物,被分解生成水和氧。</p>
<p><b>溶酶体</b></p>	<p>溶酶体是单膜泡囊,直径为0.25—0.5微米,含有水解酶类,如核糖核酸酶与磷酸酶。</p>	<p>溶酶体的功能在于消化那些经过吞噬或胞饮作用摄入细胞内的物质。它们也能消化死亡细胞的细胞成分。</p>
<p><b>内质网及核糖体</b></p>	<p>内质网由扁平的单膜泡囊组成,其内室(即池)互相沟通,形成贯穿细胞质的渠道。在粗面内质网上,散布着比原核生物还要大的核糖体。</p>	<p>由附着的核糖体所合成的蛋白质,通过内质网的膜而进入池内空隙中,而池内空隙是通往细胞周围,进行细胞内转运的高度分支的渠道。与原核生物一样,非附着的核糖体也能合成蛋白质。</p>

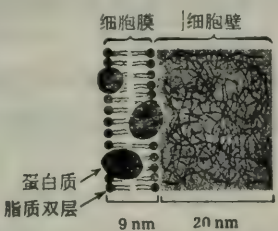




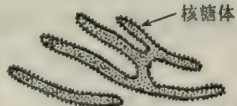


梯牧草叶的薄壁细胞切片的电子显微镜照片

图 1-9 一种高等植物的具有光合作用的叶细胞的结构组织

高等植物叶的叶肉 (mesophyll) 薄壁细胞在光合作用中很活跃。这些细胞含有动物真核细胞内所特有的大多数细胞器和结构,如细胞核、线粒体、高尔基器、内质网及核糖体等。此外,叶细胞还含有另外三种在动物细胞内一般没有的主要结构,即质体(包括叶绿体)、大液泡,以及厚实坚硬的细胞壁。绿叶细胞富于一种分布在叶绿体上的色素——叶绿素。薄壁细胞的主要生物化学活性,是从  $\text{CO}_2$  和水通过光合作用生成葡萄糖,并以淀粉形式将它贮存起来。在暗处,光合细胞消耗大气中的氧,以氧化葡萄糖及其它燃料



示意图	分子组成	性质与功能
<p><b>细胞壁与膜</b></p>  <p>细胞膜   细胞壁</p> <p>蛋白质</p> <p>脂质双层</p> <p>9 nm 20 nm</p>	<p>植物细胞壁厚而坚硬，且似盆状。细胞壁是由包在多糖和蛋白质粘合物中的纤维素原纤维组成。</p> <p>通常，植物细胞膜其厚度、结构及组成均类似于动物细胞膜，但其脂类成分稍有不同。</p>	<p>相当多孔的细胞壁可保护细胞膜，使免受机械的及渗透的破裂，池可牢固地固定细胞的位置，同时使植物组织具有一定的物理形状与坚韧度。</p> <p>植物细胞的细胞膜具有选择性的通透性，并含有对特殊的营养物质，无机离子以及某些酶类的主动转运系统。</p>
<p><b>核</b></p>  <p>核仁</p> <p>核膜</p>	<p>植物细胞核、核仁及核膜，在结构与组成方面大体与动物细胞类似。</p>	<p>象动物细胞一样，植物细胞的染色体也经过其 DNA 进行复制。</p>
<p><b>叶绿体</b></p>  <p>类囊体</p>	<p>高等植物细胞含有特征性的质体，是被膜包着的细胞器，其中有些具有特定的 DNA，含有叶绿素的那些质体则称为叶绿体。</p> <p>叶绿体比线粒体大些。每个细胞可能有一个、几个或许多个叶绿体，这取决于种属不同。叶绿体可有不同的形式。</p>	<p>叶绿体是光能接收器，能将光能转变为 ATP 的化学能，因而从 CO<sub>2</sub>、H<sub>2</sub>O 及其它前体生物合成葡萄糖及其它有机生物分子。在植物光合作用时产生氧。叶绿体是在光照下供给光合细胞能量的主要来源。</p>
<p><b>线粒体</b></p> 	<p>线粒体存在于所有的植物细胞中，包括光合细胞。其结构组织以及其分子组成和酶的成分都类似于动物细胞的线粒体。它们也含有特殊类型的 DNA。</p>	<p>象动物细胞一样，植物细胞的线粒体促进营养物的氧化，并使其能量转变为 ATP。在非光合作用的植物细胞中，线粒体是需呼吸作用供给能量的主要来源。在光合细胞中，在暗处时，线粒体呼吸是能量的主要来源。</p>
<p><b>液泡</b></p>  <p>有机酸糖类、盐、蛋白质、O<sub>2</sub>、CO<sub>2</sub> 及色素等</p>	<p>液泡是植物细胞的特征。在年幼的细胞内液泡很小，但随着年龄的增长而变大，常使细胞质被压缩在细胞壁上。液泡内含有溶解的糖类、有机酸的盐、蛋白质、矿物盐、色素、氧与二氧化碳。</p>	<p>液泡分隔植物细胞的代谢废物，并移除盐与其它溶质，在细胞生命过程中，溶质在液泡中的浓度不断增加，有时某些溶质在液泡内可结晶析出。</p>
<p><b>内质网</b></p>  <p>核糖体</p>	<p>植物细胞的内质网，在结构上类似于动物细胞，但是，植物细胞核糖体的大小、化学成分与动物细胞略有不同。</p>	<p>核糖体是植物细胞中蛋白质合成的场所，内质网是作为蛋白质产物通过细胞质的通道。</p>

酸残基中的两个氨基酸,但却改变了镰状细胞血红蛋白分子的结构,以致它不能正常地与邻近分子一道“堆叠”。这个缺陷本身又引起整个红细胞形态的深刻变化,使成为镰刀状或新月状,而正常的红细胞则是扁平盘状。结果镰状红细胞在小血管内聚集,可阻断循环并引起其它的严重紊乱。因此,一个简单的小氨基酸分子(重量约为 100 道尔顿;长约 0.7 毫微米)结构上只要有一点很小的改变,就不仅引起血红蛋白分子的深刻的变化(此氨基酸是血红蛋白分子的一个组分),也能引起整个红细胞深刻的变化,而红细胞却是比血红蛋白大很多的构造(重量约为  $1 \times 10^{14}$  道尔顿,直径为 7.000 毫微米)。

为提供关于各种生物结构之相对大小的某些参考材料,表 1-9 列出一些具有代表性的结构单位分子、细胞大分子、超分子装置、细胞器、病毒以及细胞等的重量和大小的数据。

## 细胞的结构组织

在本书中,我们将始终把每种生物分子的结构和动态功能同各种细胞成分的结构与生物学作用联系起来进行讨论,这些细胞组分包括细胞壁、膜、核糖体、叶绿体、收缩系统、内质网及细胞核等。因此,在我们开始详细讨论生物分子之前,有必要复习一下不同类型细胞的主要结构特征,其内部细胞器的大小与分子组成,以及在这些内部结构中活细胞功能的分室和分区。下面将用图表(图 1-7 至图 1-9)来进行综合和复习,三个图表分别介绍三种类型的细胞。第一种细胞是大肠杆菌,在生物化学和遗传学上它是原核细胞这一大类中最为人们所熟知的代表(图 1-7)。第二种细胞是鼠的肝细胞,它是另一大类细胞——真核细胞中研究得较透彻的一个(图 1-8)。大肠杆菌细胞与肝细胞都是从环境中摄取有机营养分子,进行氧化而获得其能量。图 1-9 表示光合细胞的一个例子,这种细胞是从太阳光获得能量。所选择的这个细胞来自高等植物的绿叶,它也是一种真核细胞。

今天的生物化学日益增多地涉及到细胞及其细胞器的结构。某些最说明问题的近代进展就是来自结合生物化学和形态学对细胞过程进行研究的结果。我们将要讨论到,近代生物化学的基本目标不仅是证明中间代谢的酶促反应的机理及本质与遗传讯息的复制和传递,而且还要确定这些变化发生在细胞的哪个部位,以及在细胞各部位发生的生化变化在空间上与时间上是如何协调的。生物化学与细胞生物学之间的界限变得愈来愈难以划分,因为细胞科学的这些领域确实已形成了有逻辑的连续。因此,应用精密的化学和物理的方法分析细胞成分的结构正提供一些有意义的新资料,使能深入了解在活细胞内生物分子的功能,以及它们相互间的动力学相互作用。

## 摘 要

在地壳内已发现的 90 种化学元素中,生命物质只需要 27 种;而大多数活机体总重量的 99% 是由碳、氢、氮和氧四种元素构成的。活细胞中全部非水部分,几乎都是由含碳有机化合物所组成,它们在其它状态在地球表面是很少见的。碳似乎独特地适宜于构成生物分子的骨架,因为碳能与氢、氧及氮,特别是能和其它碳原子形成稳定的共价键。

存在有一个细胞的分子组织系统。从周围环境获得简单的前体(如  $\text{CO}_2$ 、 $\text{H}_2\text{O}$  及氨



等),用以形成结构单位分子,如氨基酸、核苷酸、糖及脂肪酸。这些结构单位分子又进一步共价地结合形成各种大分子——蛋白质、核酸、多糖及脂类。大分子则通过非共价结合形成超分子复合物。最后,超分子复合物则装配成细胞器。

第一代原始细胞可能是从相对少量的原始生物分子所形成的,这些原始生物分子可能包括有 20 种  $\alpha$ -氨基酸、5 种嘌呤和嘧啶碱、两种糖、一种脂肪酸、甘油及胆碱。从这些原始的生物分子演化成几百种其他的生物分子,它们在各种生物内担负着更专门化的和分化了的功能,原始的生物分子可能起源于非生物,即由原始大气的某些成分在辐射能和闪电放电的作用下相互作用生成的。一般认为,原始海洋含有大量简单的有机化合物。从这种原始“肉汤”中挑选出那些最适宜于第一代活机体的形成和生存的分子。可以想像,生物分子是最简单的、最多变的,而且对于它们在细胞内的多种功能来说又是最适宜的分子。生物分子的大小、形状及表面特性,对于其生物学相互作用的特异性,以及作为大分子的结构单位的作用方面,同样都是极为重要的。

[蒋德昭译 朱定尔校]

## 参 考 文 献

### 书籍

- Fawcett, D. W.: *The Cell: An Atlas of Fine Structure*, Saunders, Philadelphia, 1966. Excellent electron micrographs of cells and their organelles and inclusions.
- Henderson, L. J.: *The Fitness of the Environment*, Macmillan, New York, 1927; reprinted 1958. A classic statement.
- Hendrickson, J. B.: *The Molecules of Nature*, Benjamin, New York, 1965. A paperback review of the structural interrelationships among alkaloids, terpenes, acetogenins, and other natural products.
- Ledbetter, M. C., and K. R. Porter: *Introduction to the Fine Structure of Plant Cells*, Springer-Verlag, New York, 1970.
- Loewy, A., and Siekevitz, P.: *Cell Structure and Function*, 2nd ed., Holt, New York, 1970.
- Oparin, A. I.: *Life: Its Nature, Origin, and Development*, Academic, New York, 1962.
- Orgel, L.: *The Origins of Life: Molecules and Natural Selection*, Chapman & Hall, London, 1973. Up-to-date summary of modern research on the origin of biomolecules.
- Porter, K. R., and Bonneville, M. A.: *Fine Structure of Cells and Tissues*, Lea & Febiger, Philadelphia, 1972.
- Speakman, J. C.: *Molecules*, McGraw-Hill, New York, 1966. Paperback on the structure and properties of molecules in relation to biology.
- Wolfe, S. L.: *Biology of the Cell*, Wadsworth, Belmont, Calif., 1972. Another textbook of cell biology.
- 论文
- Frieden, E.: "The Chemical Elements of Life," *Sci. Am.*, 227: 52—64 (1972). An interesting account of the role of various chemical elements in biology.
- Palade, G. E.: "The Organization of Living Matter," pp. 179—203, in *The Scientific Endeavor*, Rockefeller Institute Press, New York, 1964.
- Wald, G.: "The Origins of Life," pp. 113—134, in *The Scientific Endeavor*, Rockefeller Institute Press, New York, 1964.

## 第二章 水

水不仅组成生命大多数种类的重量的 70—90%，它也代表了活机体的连续相。由于它很寻常且到处都有，因而水常被认为是一种温和的惰性液体，在活机体中只不过是一种填料。然而，实际上水是一种具有不平常特性的、反应性很高的物质，它和绝大多数其它普通液体有显著的区别。现在我们认识到，水和它的电离产物——水合氢离子和氢氧离子——是蛋白质、核酸、以及膜、核糖体和其它很多细胞成份的特殊结构和生物特性方面的重要决定因素。

### 水的物理性质及氢键结合

与  $\text{H}_2\text{S}$  或  $\text{NH}_3$  一类氢化物比较，水的熔点、沸点、蒸发热、熔解热和表面张力都较高，就这点而论，与大多数普通液体比较，水也是较高的。所有这些性质表明液体水分子间的吸引力，因而它的分子内聚力是较高的。例如，表 2-1 所示，水的蒸发热比所列的其它任何普通液体都高得多。蒸发热是直接衡量克服液体内部相邻分子间吸引力所需能量的尺度，克服了分子间的吸引力，各个分子才能彼此分离，而进入气体状态。

表 2-1 某些普通液体在它们的沸点(1.0大气压)情况下的蒸发热

液 体	$\Delta H_{\text{蒸发}}$ 卡/克
水	540
甲醇	263
乙醇	204
<i>n</i> -丙醇	164
丙酮	125
苯	94
氯仿	59

液态水分子间的强大吸引力是由于水分子内电子的特殊分布。通过氢原子的  $1s$  轨道与氧原子的两个杂化轨道  $sp^3$  的相互重叠，两个氢原子分别与氧原子共用一对电子。利用光谱分析和 X 射线分析， $\text{H}-\text{O}-\text{H}$  精确的键角为  $104.5^\circ$ ，氢-氧原子间的平均距离是 0.0965 毫微米(图 2-1)。水分子中电子的这种排列产生了电的不对称性。具有很高电负性的氧原子有使氢原子唯一的一个电子脱离氢原子的趋势，留下赤裸的氢原子核。因此，两个氢原子每个都有一个局部的部分正电荷(以  $\delta^+$  表示)，而氧原子也有局部的部分负电荷(以  $\delta^-$  表示)位于没有共同轨道的区域。因此，虽然水分子没有净电荷，但它是一个电偶极。

当两个水分子彼此紧密靠近时，一个水分子的氧原子上部分负电荷，与一个邻近水分



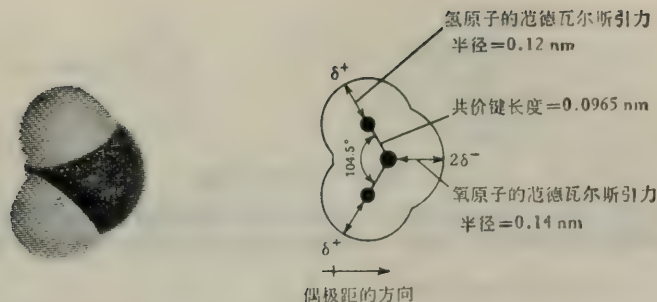


图 2-1 水分子。实体模型的轮廓代表范德瓦耳斯引力与排斥力平衡时的边界，(右面)在实体模型图轮廓的内部显示出“球和棒”，或水分子模型的晶体图，表明了键角和长度。

子的氢原子上部分正电荷之间发生静电吸引，随即发生两个分子中电子电荷的再分配，这大大增强了他们的相互作用。这种复杂的静电结合称为氢键。因为氧原子外围电子的排列近似于四面体，所以每个水分子可能通过氢键与邻近的四个水分子结合（图2-2）。就是这个特性使液态水具有大的内聚力。

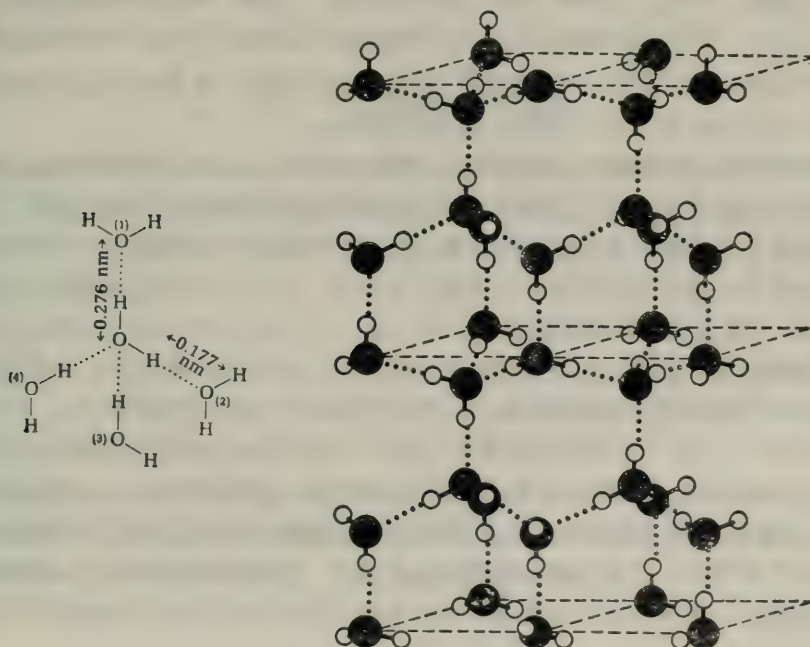


图 2-2 (左图)在冰中围绕一个水分子呈四面体形的氢键结合。分子 1 和 2 与中央的分子在页的同一平面，分子 3 在页的上面，分子 4 在页的后面(右图)。水分子在冰中的晶格示意图。(J. D. Watson, *The Molecular Biology of the Gene*, p. 120 1965)

氢键比共价键弱。据估计，液态水中氢键的键能仅约 4.5 千卡/克分子，与水分子中共价 H—O 键比较，后者键能为 110 千卡/克分子（注意，键能是断裂一个键所需的能量）。氢键的另一个重要性质是当两个相互作用的基团朝向一定方向而产生最大的静电吸引力时，则氢键也最强（图 2-3）。氢键也具有特定的键长，根据所结合的分子的几何结构与分子内电子的分布，各类氢键的键长不同。例如，在冰中每个氢键的键长是 0.177 毫微米。（图 2-2）



图 2-3 氢键的方向性

(左图) 当 O—H 键与接受的原子在一直线上时, 形成的氢键具有最大的稳定性。

(右图) 当接受的氧原子不在 O—H 键的电向量上面时, 形成一个较弱的氢键。

## 液态水的结构

水分子间的氢键不仅在液态水中存在, 而且也在冰和水蒸汽中存在。在最常见的称为冰 I 的结晶形状中, 每个水分子都通过氢键与恰好四个最接近的水分子结合, 在一个整齐的晶格中, 氧与氧之间的平均距离为 0.276 毫微米。液态水在 0℃ 情况下, 任何时候每一水分子总是通过氢键与平均约 3.6 个其它的水分子相结合; 其氧与氧间的平均距离, 比在冰中只稍微大一点, 在 15℃ 时约 0.29 毫微米, 在 83℃ 时约 0.305 毫微米。当冰在 0℃ 融化为水时, 按照冰的熔解热估计, 冰中的氢键仅一小部分, 大约 10% 被断裂。因此认为, 液态水的分子排列只有短距离次序, 而没有长距结构。液态水的高蒸发热和高介电常数表明, 在 100℃ 时水分子间仍有强的氢键结合。

在冰和液态水之间氢键结合的程度仅有微小的差别, 从冰的坚硬性和液态水的流动性看, 似乎令人惊奇。这可通过液态水中氢键的高速形成和断裂来部分说明。虽然任何时候液态水中绝大多数分子是氢键相连的, 然而每个氢键的半衰期仅约  $10^{-11}$  秒。由于液态水的短程结构是在空间和时间两方面都取平均值, 所以它仅是统计学的。因此液态水既是流动的, 又具有强的氢键结合。

对于水的结构曾提出过很多模型, 但是没有一个被实验完全证实。最简单的模型提示, 液态水是由水分子的冰样群组成, 它们与游离水分子处于不稳平衡中。其它模型提出, 液态水包含三个或更多类型的氢键结合成份。还有另一个连续模型提示, 虽然当冰融化时, 0℃ 冰里水分子间绝大多数的氢键仍未破坏, 但它们被歪曲了, 也就是说, 如图 2-3 所示, 从最稳定的直线构形弯曲成不同角度。液态水的温度愈高, 则歪曲愈大且愈不稳定。在这个模型中, 个别短的生命范围的水分子, 虽然高度氢键化了, 仍偏离冰的整齐晶格结构甚多。显然继续研究液态水的结构对于生物化学和分子生物学将有很大的意义。

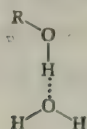
## 氢键的其它性质

氢键并非水所特有的。在小的电负性强的原子, 如氧、氮或氟和以共价键与另一个这种电负性原子结合的氢原子之间有形成氢键的倾向。氢键可以在两个分子之间形成或在同一分子的两部分之间形成。图 2-4 列出了某些生物学上有重要意义的氢键。

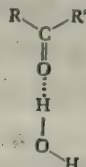
当两个分子通过单个氢键联结时, 在水溶液体系中, 这个键将是很弱的, 因为周围水分子与溶质分子争夺形成氢键的机会。然而若是在两个溶质分子间可能形成两个或更多



在羟基和  $H_2O$  之间



在羰基和  $H_2O$  之间



在 DNA 中互补碱基对之间

在两个肽链之间

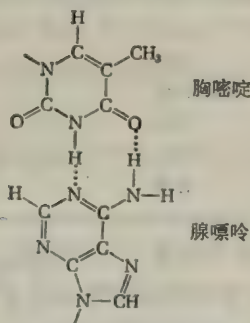
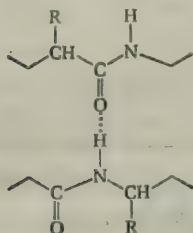


图 2-4 某些在生物学上重要的氢键

的氢键,则由于几何学上的原因,第一个氢键的建立使第二个氢键形成的机率大大增加。一旦第二个键形成,第三个键形成的机率也随之增加等等,从而在两个溶质分子间导致一个很强的联结,它能克服水分子争夺的影响。两分子间通过很多弱键合作增强了它们的吸引力,称为协作性。

协作氢键结合是蛋白质和核酸分子都有一个特征,它们可含有几十、几百、甚至成千个协作氢键。在生物学大分子中,氢键结合的协作性取决于能够形成氢键的功能基的相对位置。这正象装配起一个梯子那样。一旦一个或两个梯级固定好了,两边的直杆成行,所有其余的梯级就能很快地钉上。

在水溶液体系中,氢键的形成和断裂比大多数共价键快得多。在生物分子现象中,以上事实和氢键的几何学特性与方向性等,使得氢键在生物学优越性上大大超过了共价键,如蛋白质折叠成为它们天然的构型,必须以极高的速率产生。

## 水的溶媒性质

水是一种比大多数普通液体好得多的溶媒。很多结晶的盐类和其它离子化合物都很容易溶解在水中,但几乎不溶于象氯仿或苯一类非极性液体中。由于盐类的晶格,例如氯化钠,是通过交替排列的正离子和负离子之间很强的静电吸引力结合在一起的,需要相当大的能量才能使这些离子彼此分开。然而水很容易溶解晶体氯化钠,这是由于水的偶极和  $Na^+$  与  $Cl^-$  离子之间强的静电吸引,这力量远远超过  $Na^+$  和  $Cl^-$  相互吸引的倾向,造成了很稳定的水合  $Na^+$  与  $Cl^-$  离子。水也具有对抗正负离子间静电吸引的倾向。这种倾向可用介电常数  $D$  表明,它由下述关系所决定

$$F = \frac{c_1 c_2}{Dr^2}$$

$F$  是电荷相反的两个离子之间的吸引力,  $c_1$  和  $c_2$  是离子所带的电荷,  $r$  是它们之间的距离。如表 2-2 所示, 水有一相当高的介电常数, 而苯的介电常数很低。当距离保持一定时,  $\text{Na}^+$  和  $\text{Cl}^-$  离子之间的吸引力只有在苯中的  $1/40$ , 这极有利于水对晶格的解除。

表 2-2 20°C 时某些液体的介电常数  $D$

液 体	$D$
水	80
甲醇	33
乙醇	24
丙酮	21.4
苯	2.3
己烷	1.9

另一大类容易溶解于水的物质, 包括一些非离子的但具有极性的化合物, 如糖、简单的醇、醛和酮。它们的可溶性是由于极性功能基, 如糖和醇的羟基、醛和酮的羰基氧原子等倾向于与水分子形成氢键的缘故。(图 2-4)

## 疏水性相互作用

水还以胶粒的形式分散或增溶溶解很多既有强的非极性基又有强的极性基的化合物。这种分子称为亲水脂的分子。

倾向于形成胶粒的一种亲水脂的生物分子的一个例子是长链脂肪酸油酸的钠盐。这

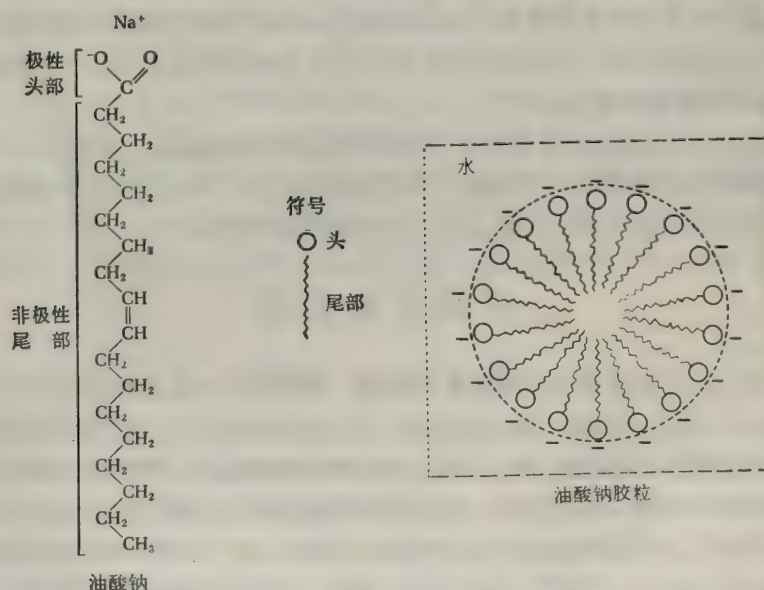


图 2-5 一个皂胶粒在水中的形式, 油酸钠的非极性尾部避开了水, 而带负电荷的羧基则暴露于水中。



个分子只有一个羧基,它是极性的,因此很易生成水合物,同时有一个长烃尾是非极性的,且本质上是不溶于水的。因为这个长的疏水尾部,油酸钠(一种皂)几乎很少倾向溶解于水产生一真离子溶液。然而,它容易分散在水中形成胶粒,在胶粒中,带负电荷的羧酸盐基团暴露在外表与水分子形成氢键,而非极性不溶解的烃链,则隐藏在胶粒内,不与水形成氢键(图 2-5)。皂胶粒带净负电荷,因静电相互排斥,故胶粒保持悬浮。这种胶粒可含有几百或甚至几千个皂分子,因为水“亲”水(和羧基)超过它“亲”非极性结构,胶粒自然地形成。胶粒中邻近的烃结构间还有由范德瓦尔斯引力相互作用提供的额外吸力。

必须着重指出,在胶粒中烃尾之间没有真实的化学计量的键。由于这个缘故,我们用疏水性相互作用这一术语,而不用“疏水键”来表述亲水脂分子中不与水接触的疏水部分的成簇或聚集更适宜些。与氢键比较,疏水性相互作用方向性比较小,但是它们倾向于产生高度稳定的体系。

以后我们将会知道,很多细胞成分是亲水脂的,而且倾向于形成非极性的,疏水部分避开水的结构,特别是蛋白质、核酸和极性脂类。

### 溶质对水性质的影响

由于溶解了的溶质的存在引起液态水结构和性质的改变。例如,当一种盐如 NaCl 溶解于水中,每个  $\text{Na}^+$  和  $\text{Cl}^-$  离子都被一层水偶极所包围。在这些离子水合物中,水分子的几何构型与纯水中由氢键结合的水分子簇不同:这些分子的结构更有条理且更整齐。表 2-3 提供了 NaCl 水溶液中离子间的平均距离,它随 NaCl 的浓度而变化。我们看到 NaCl 的浓度为 0.15 M,即与血浆中 NaCl 的浓度接近(并与细胞质中  $\text{K}^+$  盐浓度亦接近)时,  $\text{Na}^+$  和  $\text{Cl}^-$  离子之间平均仅相距约 1.9 毫微米。由于每一个水合  $\text{Na}^+$  和  $\text{Cl}^-$  离子的直径是 0.5 至 0.7 毫微米,而五个水分子构成的一个四面体分子群,其直径大约是 0.5 毫微米。当 NaCl 溶解在一接近于生物体液浓度的液态水中时,液态水的立体结构会发生颇大的改变。因此溶解的盐有“破坏”液态水自然结构的趋势。

表 2-3 NaCl 溶液中离子间的平均距离

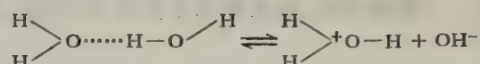
浓度, 克分子	距离, 毫微米
0.001	9.4
0.010	4.4
0.10	2.0
0.150	1.9
1.00	0.94

溶质对溶剂的影响还表现在另一组特性上,即溶液的依数性,这些特性决定于单位容积的溶剂中所含溶质颗粒的数量。溶质在溶剂中产生一些特殊的影响,如使冰点下降,沸点上升、蒸汽压降低。它们也赋予溶液一种渗透压的特性。一克分子量的一种理想的不离解、不缔合、不挥发的溶质,溶解在 1,000 克水中,在 760 毫米汞柱的压力下,使冰点下降  $1.86^\circ\text{C}$ ,沸点上升  $0.543^\circ\text{C}$ 。这种溶液在一适当的装置中测量也产生 22.4 个大气压的

渗透压(第七章)。由于水溶液常常与理想状态有差距,克分子浓度和冰点下降之间的比例性仅在很稀的溶液中,即用外推法达到溶质浓度为 0 时,这种关系才是精确的。

## 水的电离作用

因为氢原子的质量小,同时它唯一的一个电子又被氧原子紧紧地吸住,这就存在一个有限的倾向,即只要每个分子的内部能量适宜,氢原子倾向于从那个和它在同一个水分子中又与它共价结合的氧原子脱离,并“跳”到通过氢键和它结合的邻近水分子的氧原子上。



这个反应产生了两个离子,水合氢离子  $[\text{H}_3\text{O}^+]$  和羟离子  $[\text{OH}^-]$ 。用电导性测量法在  $25^\circ\text{C}$  时,一升纯水任何时候仅有  $1.0 \times 10^{-7}$  克分子  $\text{H}_3\text{O}^+$  离子和同等数量的  $\text{OH}^-$  离子。

虽然为了简便用  $\text{H}^+$  符号表示水合氢离子已成惯例,但必须特别强调在水中质子或氢离子不会有多少呈“裸露”形式存在;它们仅以水合的形式出现。况且  $\text{H}_3\text{O}^+$  或水合氢离子与水通过进一步的氢键结合,自身进一步水合形成  $\text{H}_5\text{O}_2^+$  离子,以及更高的水合形式(图 2-6)。羟离子在液态水中也能水合。

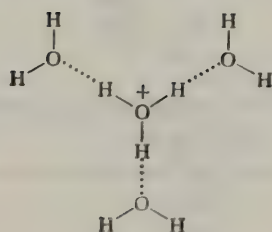


图 2-6 水合氢离子的水合形式  $[\text{H}_3\text{O}^+]$ , 其水化膜至  $100^\circ\text{C}$  仍稳定。

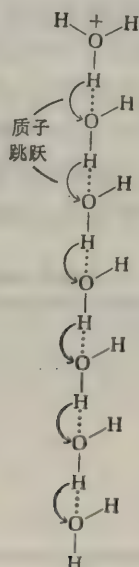


图 2-7 质子跳跃。弯曲箭头表示质子由水合氢离子到水分子连续跳跃时的路线。在液态水中,这种跳跃片刻就乱了;在冰中它们沿氢键结合的格子跳跃。在一系列跳跃的末尾,最后的  $\text{H}_2\text{O}$  分子变成了一个水合氢离子。

表 2-4 示出,  $\text{H}_3\text{O}^+$  离子在电场中移动的速度比一价的  $\text{Na}^+$  和  $\text{K}^+$  阳离子大很多倍。这个异常的结果是因为一个质子能够由一个水合氢离子很快地跳跃到一个以氢键与它结



表 2-4 在无限稀释时某些阳离子的电泳速度 (25°C)

离 子	电泳速度, (厘米 <sup>2</sup> /伏特/秒)
H <sup>+</sup>	36.3 × 10 <sup>-4</sup>
Na <sup>+</sup>	5.2 × 10 <sup>-4</sup>
K <sup>+</sup>	7.6 × 10 <sup>-4</sup>
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	7.6 × 10 <sup>-4</sup>
Mg <sup>2+</sup>	5.4 × 10 <sup>-4</sup>
Li <sup>+</sup>	4.0 × 10 <sup>-4</sup>

合的邻近水分子上。因此一个正电荷能由一个水分子到另一个水分子移动一定的距离, 而水分子本身并未移动多少。一系列这样的质子跳跃具有使质子移位远比 H<sub>3</sub>O<sup>+</sup> 离子本身的扩散或整体的移动速率高得多的效应 (图 2-7)。在冰的晶格中, 质子沿固定的水分子跳动, 可以说明这样一个事实, 即任凭冰的结构坚硬, 它有同液态水大约相同的导电性。质子通过氢键结合的水分子而传导, 称为穿通 (tunneling), 它在生物系统中可能是一个重要的现象。

### 水的离子积: pH 尺度

水的离解是一个平衡的过程:



为此我们能写出平衡常数

$$K_{\text{eq}} = \frac{[\text{H}_3\text{O}^+][\text{OH}^-]}{[\text{H}_2\text{O}]^2}$$

这里的括弧表示每升的克分子浓度。平衡常数在任一温度下的数值能够由纯蒸馏水的导电测定推算出来。因为水在纯水中的浓度很高 (等于一升中水的克数被水的克分子量除, 或  $1,000/18 = 55.5 \text{ M}$ ), 比较起来, H<sub>3</sub>O<sup>+</sup> 和 OH<sup>-</sup> 离子的浓度很低 (在 25°C 为  $1 \times 10^{-7} \text{ M}$ ), 水的克分子浓度不会因它那微弱的电离作用而有可观的变化。因此, 平衡常数的公式可以简化为:

$$(55.5)^2 K_{\text{eq}} = [\text{H}_3\text{O}^+][\text{OH}^-]$$

而  $(55.5)^2 K_{\text{eq}}$  这一项又能够用一个笼统的常数  $K_w$  以代替,  $K_w$  称为水的离子积,

$$K_w = [\text{H}_3\text{O}^+][\text{OH}^-]$$

在 25°C 时,  $K_w$  值为  $1.0 \times 10^{-14}$ 。在酸性溶液中, H<sub>3</sub>O<sup>+</sup> 浓度相对地高, 而 OH<sup>-</sup> 浓度相应地低; 在碱性溶液中的情况则相反。

$K_w$ , 水的离子积是 pH 尺度的基础 (表 2-5), pH 尺度是用以表明酸度在 1.0 M H<sub>3</sub>O<sup>+</sup> 和 1.0 M OH<sup>-</sup> 范围内的任何水溶液中 H<sub>3</sub>O<sup>+</sup> (因此也是 OH<sup>-</sup>) 离子实际浓度的方式, pH 尺度是由丹麦的生物化学家 S. P. L. Sørensen 所设计的。他为了避免麻烦的数字如 0.0000001 或  $1.0 \times 10^{-7}$  来表示生物体液中低的氢离子浓度。他规定 pH 的定义为

$$\text{pH} = \log_{10} \frac{1}{[\text{H}_3\text{O}^+]} = -\log_{10} [\text{H}_3\text{O}^+]$$

一种严格的中性溶液在 25℃

$$[\text{H}_3\text{O}^+] = [\text{OH}^-] = 1.0 \times 10^{-7} \text{M}$$

这种溶液的 pH 是

$$\text{pH} = \log \frac{1}{1 \times 10^{-7}} = 7.0$$

因此准确的中性溶液的 pH 值为 7.0, 并不是任意选定的数字;它是根据水在 25℃ 时离子积的绝对值推算出来的。必须注意 pH 的数值愈高,则氢离子的浓度愈低,反之亦然。注意 pH 尺度是对数的而不是算术的数值。如果说两种溶液的 pH 相差一个 pH 单位,意思

表 2-5 pH 尺度

$[\text{H}^+], \text{M}$	pH	$[\text{OH}^-], \text{M}$
1.0	0	$10^{-14}$
0.1	1	$10^{-13}$
0.01	2	$10^{-12}$
0.001	3	$10^{-11}$
0.0001	4	$10^{-10}$
0.00001	5	$10^{-9}$
$10^{-6}$	6	$10^{-8}$
$10^{-7}$	7	$10^{-7}$
$10^{-8}$	8	$10^{-6}$
$10^{-9}$	9	$10^{-5}$
$10^{-10}$	10	$10^{-4}$
$10^{-11}$	11	0.001
$10^{-12}$	12	0.01
$10^{-13}$	13	0.1
$10^{-14}$	14	1.0

表 2-6 某些液体的 pH

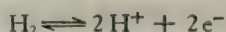
液 体	pH
海水(变化的)	7.5
血浆	7.4
细胞间液	7.4
细胞内液	
肌肉	6.1
肝脏	6.9
胃液	1.2—3.0
胰液	7.8—8.0
唾液	6.35—6.85
牛乳	6.6
尿	5—8
番茄汁	4.3
柚子汁	3.2
软饮料(可拉)	2.8
柠檬汁	2.3



是说,这种溶液比另一种溶液的氢离子浓度高十倍。表 2-6 列出了某些液体的 pH。

## pH 的 测 定

由于 pH 决定了生物大分子结构和活性的许多重要方面,从而也决定了细胞和组织的行为,所以在生物化学中 pH 的测定是极普通和最有用的分析方法之一。氢电极是测定氢离子浓度(因而也是测定 pH)所采用的基本标准,它是浸在要测定的 pH 溶液中的一种经过特殊处理的铂电极。溶液在某一已知压力和温度下与气体氢处于平衡状态。电极的电动势随着下列平衡而变化。



测定氢电极与另一已知电动势的参考电极,例如甘汞电极之间的电势差,并用它来计算氢离子浓度。

为了一般用途,氢电极已是太笨重了,现已被玻璃电极所代替,后者无需氢气,直接反应氢离子浓度。玻璃电极的反应必须用已知准确 pH 的缓冲液校准。测定 pH 的另一方法是用酸碱指示剂(见下面)。

## 酸 和 碱

G. N. Lewis 给酸和碱所下的定义既概括又完整,既适用于非水溶液体系,也适用于水溶液体系。Lewis 认为酸是一个潜在的电子对受体,而碱是一个潜在的电子对供体。然而对于描述各种稀释水溶液系统中的酸碱反应,则 J. N. Brönsted 和 T. M. Lowry 提出的公式更为广泛运用。按照 Brönsted-Lowry 的概念,酸就是质子的供体,而碱就是质子的受体(图 2-8)。一种酸-碱反应必然包含着由一个质子供体与相应的质子受体所构成的一对共轭酸碱偶。例如,乙酸( $\text{CH}_3\text{COOH}$ )是一个质子供体,而乙酸根阴离子( $\text{CH}_3\text{COO}^-$ )是这个相应的质子受体,它们共同组成共轭酸-碱偶。

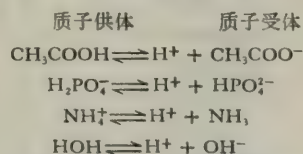


图 2-8 某些共轭酸碱对

在稀释水溶液中,一种酸 [HA] 的离解或电离的方程式涉及一个质子由酸移交给水,后者本身能作为一个质子受体以生成酸  $\text{H}_3\text{O}^+$ :



每个共轭碱对质子都有特殊的亲和力,它与  $\text{OH}^-$  对质子的亲和力相关。对水放出质子只有微弱倾向的酸是弱酸;很容易放出它们的质子的酸则是强酸。任何已知酸的这种离解倾向都用某一温度下的离解常数来表示:

$$K = \frac{[\text{H}_3\text{O}^+][\text{A}^-]}{[\text{HA}][\text{H}_2\text{O}]}$$

式中的括弧表示每公升克分子浓度。习惯上以除去质子水化作用所需要的水来简化此种

表示法:

$$K = \frac{[H^+][A^-]}{[HA]}$$

在生物化学中,习惯运用的离解常数是在规定的实验条件下,即在一定的总浓度和离子强度以及规定其它溶质的条件下,根据反应物和产物浓度的分析测定而得出的。这个常数称为近似的 (apparent) 或浓度离解常数,用  $K'$  表示,以区别于理论化学家所使用的真正的或热力学的离解常数  $K$ ,它是纠正了由于浓度和离子强度等因素对溶液系统产生的偏离理想状态的误差之后的离解常数。

某些酸和碱的近似离解常数见表2-7。应注意按 Brönsted-Lowry 公式,酸和碱是同样处理的,即仅依据质子从各类质子供体离解出来的倾向。(不使用所谓碱的离解常数,如离解反应  $NH_4OH \rightleftharpoons NH_4^+ + OH^-$  的  $K_b$ 。实际上,在 Brönsted-Lowry 公式中,  $NH_4OH$  既不是一种酸,也不是一种碱),表 2-7 提供了  $pK'$  的数值,  $pK'$  就是  $K'$  的对数变换,正如 pH 数值是  $[H^+]$  的对数变换一样:

$$pK' = \log \frac{1}{K'} = -\log K'$$

掌握  $pK'$  值比  $K'$  值麻烦少些,正如 pH 数值比实际的氢离子克分子浓度少些麻烦一样。强酸的  $pK'$  值低,而强碱的  $pK'$  值则高。注意水本身可以看作是  $pK'$  约为 14 的很弱的酸;它的共轭碱、氢氧离子,明显地是很强的碱,对质子有很高的亲和力。

表 2-7 某些酸表现的离解常数和  $pK'$  (25°C)

酸(质子供体)	$K', M$	$pK'$
HCOOH	$1.78 \times 10^{-4}$	3.75
CH <sub>3</sub> COOH	$1.74 \times 10^{-5}$	4.76
CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> COOH (丙酸)	$1.35 \times 10^{-5}$	4.87
CH <sub>3</sub> CHOHCOOH (乳酸)	$1.38 \times 10^{-4}$	3.86
COOHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> COOH (琥珀酸)	$6.16 \times 10^{-5}$	4.21
COOHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> COO <sup>-</sup>	$2.34 \times 10^{-6}$	5.63
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	$7.25 \times 10^{-3}$	2.14
H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	$6.31 \times 10^{-8}$	7.20
HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	$3.98 \times 10^{-13}$	12.4
H <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	$1.70 \times 10^{-4}$	3.77
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	$6.31 \times 10^{-11}$	10.2
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	$5.62 \times 10^{-10}$	9.25
CH <sub>3</sub> NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>	$2.46 \times 10^{-11}$	10.6

图 2-9 表明某些弱酸用氢氧化钠滴定的滴定曲线。以每次增加 NaOH 之后 pH 值的结果为纵坐标,相应的 OH<sup>-</sup> 增加为横坐标,绘制滴定曲线。各种酸的滴定曲线形状很相似,重要的区别在于曲线沿 pH 尺度垂直地推移。与滴定中点相截的 pH,其数值等于被滴定酸的  $pK'$ 。在中点,酸的质子供体 [HA] 和质子受体形式 [A<sup>-</sup>] 的克分子浓度相等。事实上,只要已知这一点上质子供体和受体形式的浓度,就能从某一酸的滴定曲线上任何一点的 pH 推算出它的  $pK'$  值。滴定曲线的形式能够用 Henderson-Hasselbalch 公式来表示,这一公式是以对数的变换来表述离解常数。推导如下:



$$K' = \frac{[H^+][A^-]}{[HA]}$$

求  $H^+$ :

$$H^+ = K' \frac{[HA]}{[A^-]}$$

取两边的负对数:

$$-\log [H^+] = -\log K' - \log \frac{[HA]}{[A^-]}$$

以 pH 代  $-\log [H^+]$ , 以  $pK'$  代  $-\log K'$

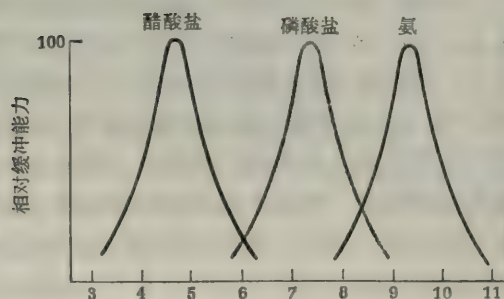
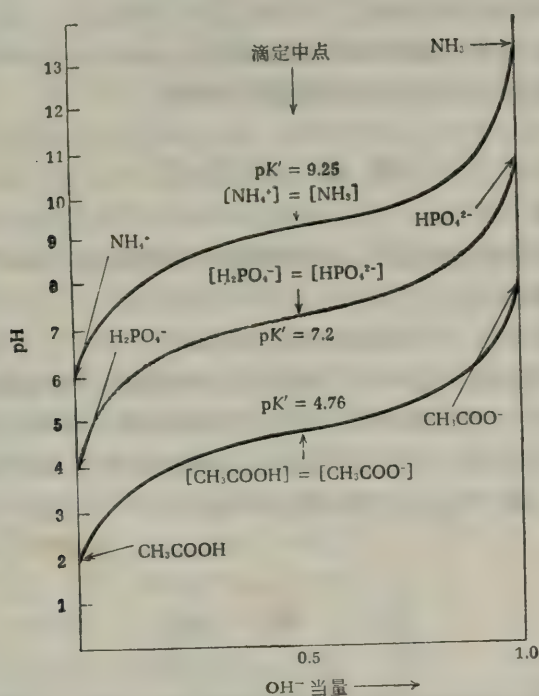


图 2-9 (上图) 某些酸的酸-碱滴定曲线, 在滴定的开始、中点和末尾标明了主要的离子形式。(下图) 曲线表示这些酸的相对缓冲能力与 pH 的关系。在  $pH = pK'$  时, 缓冲能力最大。这时增加酸或碱后, pH 仅有很小的变化。

$$\text{pH} = \text{pK}' - \log \frac{[\text{HA}]}{[\text{A}^-]}$$

我们现在若改变符号,就得到 Henderson-Hasselbalch 公式:

$$\text{pH} = \text{pK}' + \log \frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]}$$

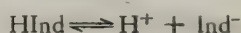
它较通用的公式为

$$\text{pH} = \text{pK}' + \log \frac{[\text{质子受体}]}{[\text{质子供体}]}$$

这个公式使我们能够从质子供体和质子受体的克分子浓度比,计算出任何酸在一定 pH 时的  $\text{pK}'$ ,就能够由已知  $\text{pK}'$  和克分子浓度比计算出某一共轭酸碱对的 pH,并且能够由已知 pH 和  $\text{pK}'$  计算出质子供体和质子受体的克分子浓度比。注意当质子供体和质子受体的浓度相等时则所得到的 pH 数值与  $\text{pK}'$  相等。Henderson-Hasselbalch 公式是对生物系统所有的酸碱平衡进行定量处理所依据的基本原理。

## 酸碱指示剂

溶液的 pH 能用指示剂染料测定,大多数指示剂为弱酸(以 HInd 表示)。这样一种指示剂按以下平衡式离解:



我们假定 HInd 为无色。而  $\text{Ind}^-$  为有色。这种离解的平衡位置以及  $\text{Ind}^-$  在其特定波长处吸收的光量,决定于周围的氢离子浓度。在强酸溶液中平衡向左移,此时在  $\text{Ind}^-$  的最大吸收的波长处,将只有极少量的光被吸收。在碱性溶液中,由于过量  $\text{OH}^-$  离子与  $\text{H}^+$  离子反应生成  $\text{H}_2\text{O}$  使  $\text{Ind}^-$  形式占优势,因此平衡拉向  $\text{Ind}^-$  一边。在这种情况下将有大量的光被吸收。

## 缓冲剂

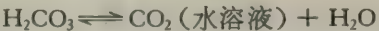
图2-9表明每种酸的滴定曲线都有一个比较平的滴定区带,从它的中点向两边伸延约 1.0 pH 单位。在这个区带里增加少量  $\text{H}^+$  或  $\text{OH}^-$ , 溶液系统的 pH 变化较小。这就是共轭酸碱对起缓冲作用的区域,当  $\text{H}^+$  或  $\text{OH}^-$  增加时,这个系统倾向于阻碍 pH 的改变。若在这个区带之外的 pH 值上,则阻碍 pH 变化的能力减小。在滴定曲线的正中点上, pH 缓冲能力最大,在这点上质子受体的浓度等于质子供体的浓度,而且  $\text{pH} = \text{pK}'$  (图 2-9)。由于受质子受体和质子供体形式浓度比变化的直接影响,从这点上增高或降低 pH 都会降低缓冲能力。每一共轭酸碱对都有一个缓冲能力最大的特殊 pH, 即  $= \text{pK}'$  的 pH。

活机体的细胞内液和细胞外液中都含有共轭酸碱对,它们在这些液体正常 pH 下起缓冲作用。细胞内主要缓冲剂有  $\text{H}_2\text{PO}_4^- - \text{HPO}_4^{2-}$  ( $\text{pK}' = 7.2$ ) 共轭酸碱对。有机磷酸盐,如葡萄糖-6-磷酸和 ATP 也在细胞内具有缓冲能力。重碳酸盐缓冲系统是脊椎动物血液和细胞间液中主要的缓冲剂。血浆非凡的缓冲能力能由下面的对比看出。由于 NaCl 溶液没有缓冲能力,如果将 1 毫升 10N 的 HCl 加到 1.0 升中性的生理盐水中,即约 0.15 M NaCl,



盐水的 pH 将下降到 pH 2.0。然而若将 1 毫升 10 N 的 HCl 加到 1 升血浆中,则 pH 将由 7.4 稍微下降到 7.2 左右。在 Henderson-Hasselbalch 公式解答问题时,将最易感觉到缓冲作用。

重碳酸盐缓冲系统 ( $\text{H}_2\text{CO}_3\text{--HCO}_3^-$ ) 有一些突出的特点。虽然它和其它酸碱对以同样方式在起缓冲作用,但  $\text{H}_2\text{CO}_3$  是比较强的酸,它的  $\text{pK}'$  约为 3.8 (表 2-7), 这比血液 pH 的正常范围低得多。因此,问题发生了,为什么  $\text{pK}'$  值这样低的酸在 pH 接近 7.0 时能作为一种生理缓冲剂。在重碳酸盐缓冲系统里,质子供体形式碳酸与溶解的  $\text{CO}_2$  处于可逆的平衡中:



假如这样一个水溶液系统与一气相接触,则所溶解的  $\text{CO}_2$  也将气相与水溶液之间达到平衡:



由于按 Henry 氏定律,一种气体在水中的溶解度与它的分压成正比例,重碳酸盐缓冲系统的 pH 是缓冲液上气相中  $\text{CO}_2$  分压的函数。如果所有其它可变量都保持恒定,只  $\text{CO}_2$  分压增加,则重碳酸盐缓冲液的 pH 下降,反之亦然。在 pH 接近 7.0 时,质子受体与质子供体的比值很高,而重碳酸盐系统能够有效地缓冲血浆,是因为小量质子供体  $\text{H}_2\text{CO}_3$  与肺内相对大量贮存的气体  $\text{CO}_2$  处于不稳定的平衡中。在血液必须吸收过量  $\text{OH}^-$  的情况下,  $\text{H}_2\text{CO}_3$  耗尽了变成为  $\text{HCO}_3^-$ , 又从肺内气体  $\text{CO}_2$  大库中很快得到补充。

重碳酸盐缓冲系统还有另一突出特点。 $\text{CO}_2$  是能源分子需氧氧化的主要终产物,而且在哺乳动物最后由肺呼出。血液中  $[\text{HCO}_3^-]/[\text{H}_2\text{CO}_3]$  的稳态比值是组织氧化过程中产生  $\text{CO}_2$  的速度和由呼气失去  $\text{CO}_2$  的速度的一个反映。

哺乳动物血浆的 pH 保持在非常恒定的数值。人血浆的正常 pH 值为 7.40。若 pH 象患病时那样出现调节机构失灵,血液 pH 下降至低于 7.0 或上升至高于 7.8, 则可能发生不可弥补的损害。我们不禁要问: 在细胞中是什么分子机制如此地敏感,氢离子浓度的改变小到只有  $3 \times 10^{-8} \text{ M}$  (大致是血浆 pH 在 7.4 或 7.0 之间的差距) 就能够致死? 虽然细胞结构和机能的很多方面都受 pH 的影响,但酶的催化作用却特别地敏感。图 2-10 中的典型曲线表明,在某一特定的 pH 酶的活性最大,故称此 pH 为最适 pH,而在最适 pH 的任何一边,其活性都将急剧地下降。因此,对于中间代谢和细胞功能的所有方面,细胞和体液 pH 的生物调节是极为重要的。

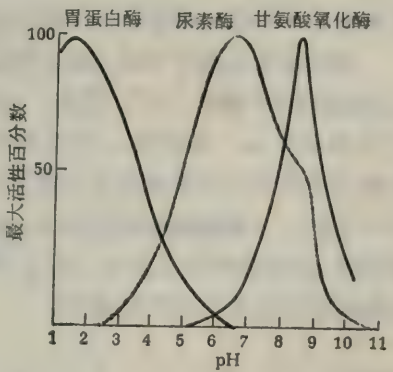


图 2-10 pH 对某些酶活性的影响。每种酶都有一特有的 pH 活性曲线图。pH 不仅对酶,而且对辅酶和底物分子的离解程度都能有影响。

### 水环境对活机体的适宜性

活机体已经有效地适应了它们的含水环境,甚至产生了利用水的异常特性的办法。

水的比热高,这对陆地上大动物是有利的,因为机体内水可作为热缓冲剂,在气温波动时,仍允许机体的温度保持相对恒定。而且,脊椎动物也利用了水的高蒸发热,汗的蒸发是散热的一种有效方式。高等植物利用液态水由于氢键而有很强的内聚力,在蒸发作用中将溶解的养料从根部输送到叶。甚至冰的比重比液态水低,因而浮在水上,这一事实对水生生物的生态具有重要的生物学影响,但是我们将会知道,对所有活机体最重要的是细胞大分子,特别是蛋白质和核酸的很多重要生物性质,是由它们与周围环境中水分子相互作用而衍生出来的。

## 摘 要

水是活机体中最丰富的化合物。它的比较高的冰点、沸点、蒸发热和表面张力,都是由于邻近水分子间具有氢键结合形式的强烈的相互吸引力的结果。液态水颇具有短程秩序,虽然个别氢键的半衰期都很短。

水分子的极性和氢键结合特性使它成为很多离子化合物和中性分子的高效溶剂。水也使亲水脂的分子,如肥皂,分散形成胶粒,胶粒中分子群的疏水基避开水不与之接触,而亲水基或极性基则分布在外表向着水。胶粒的形成是由于周围水分子倾向于以最大量的氢键相互结合,以及与分布在胶粒外表的极性基团结合的结果。

水只稍微离解以形成水合氢离子( $\text{H}_3\text{O}^+$ )和羟离子( $\text{OH}^-$ )。质子很容易地由 $\text{H}_3\text{O}^+$ 跳跃到邻近以氢键结合的水分子上。这种质子跳跃是质子在水和冰中具有很高电迁移率的原因。在稀的水溶液中, $\text{H}^+$ 和 $\text{OH}^-$ 离子的浓度按照

$$K_w = [\text{H}^+][\text{OH}^-] = 1 \times 10^{-14}(25^\circ\text{C})$$

公式成反变关系。生物体系的氢离子浓度用pH表示,它的定义为 $\text{pH} = -\log [\text{H}^+]$ 。水溶液的pH可用玻璃电极或指示剂测定。

酸的定义为质子供体,碱则为质子受体。一个共轭酸碱对是由一质子供体(HA)和它相应的质子受体( $\text{A}^-$ )组成。在水溶液中,一种酸提供质子的倾向可用它的离解常数 $K'$ 或其函数 $\text{p}K'$ 来表示, $\text{p}K'$ 的定义为 $-\log K'$ 。在一种弱酸溶液的pH,它的 $\text{p}K'$ 和它的质子受体与质子供体形式的浓度比之间有量的关系。这个关系就是Henderson-Hasselbalch公式。一共轭酸碱对能作为一种缓冲剂抵制溶液pH的改变;在pH与它的 $\text{p}K'$ 数值相等时,它的缓冲能力最大。最重要的生物缓冲对有 $\text{H}_2\text{CO}_3\text{-HCO}_3^-$ 和 $\text{H}_2\text{PO}_4^-\text{-HPO}_4^{2-}$ 。pH对酶的催化作用有强烈的影响。

## 参 考 文 献

生物化学和物理化学方面的一般参考著作列于附录B。

### 书籍

- Davenport, H. W.: *ABC of Acid-Base Chemistry* 5th ed., University of Chicago Press, Chicago, 1969.  
Dawes, E. A.: *Quantitative Problems in Biochemistry*, 5th ed., Williams & Wilkins, Baltimore, 1968.  
Succinct treatment of quantitative aspects of biochemistry; problem solving.  
Dick, D. A. T.: *Cell Water*, Butterworth, Washington, D. C., 1966. Structure, properties, movement, and control of cellular water.  
Edsall, J. T. and J. Wyman: *Biophysical Chemistry*, vol. 1, Academic, New York, 1958. Detailed treatment of water and solutions of electrolytes, including amino acids.



- Eisenberg, D., and W. Kauzmann: *The Structure and Properties of Water*, Oxford University Press, Fair Lawn, N.J., 1969. Most recent and authoritative monograph.
- Henderson, L. J.: *The Fitness of the Environment*, Macmillan, New York, 1927; reprinted 1958. A classic statement which is still absorbing reading.
- Montgomery, R., and C. A. Swenson: *Quantitative Problems in Biochemical Sciences*, Freeman, San Francisco, 1969. Problems in acid-base chemistry and buffer action, as well as in many other aspects of biochemistry.
- Morris, J. G.: *A Biologist's Physical Chemistry*, Addison-Wesley, Reading, Mass., 1968. An excellent primer; chapters 5 and 6 are especially useful.
- Segel, I. H.: *Biochemical Calculations*, Wiley, New York, 1968. Another useful book on quantitative aspects of biochemistry.

## 论文

- Narten, A. H., and H. A. Levy: "Observed Diffraction Pattern and Proposed Models of Liquid Water," *Science*, 165: 447—454 (1969). A discussion of different hypotheses for the structure of liquid water.
- Wicke, E.: "Structure, Formation, and Molecular Mobility in Water and Aqueous Solutions," *Angew. Chem. Int. Ed. (Engl.)*, 5: 106—112 (1966).

## 习 题

酸和碱以及缓冲剂的许多问题在生物化学研究的许多操作中都很重要,特写出以供练习。

### 1. 试计算:

- $10^{-3}N$  HCl 的 pH
- $5 \times 10^{-3}N$  NaOH 的 pOH
- $3 \times 10^{-4}N$  KOH 的 pH
- $10^{-2}N$  HCl 的 pH
- $3 \times 10^{-4}N$  HCl 的 pOH
- $7mM$   $H_2SO_4$  的 pH

### 2. 试计算以下问题(见表 2-6):

- 血浆的  $[H^+]$
- 肌肉细胞内液的  $[H^+]$
- 番茄汁的  $[OH^-]$
- 胃液的  $[H^+]$  (pH 1.4)
- 唾液的  $[OH^-]$  (pH 6.5)
- 海水的  $[H^+]$

### 3. 已知酸 HA 的 $0.01M$ 溶液的 pH 是 3.80。试计算该酸的 (a) $K'$ , (b) $pK'$ 。

### 4. 一个酸 HA 的离解度 $\alpha$ , 由以下关系所决定

$$\alpha = \frac{[A^-]}{[A^-] + [HA]}$$

试计算醋酸 ( $pK' = 4.76$ ) 在 (a)  $0.1M$  和 (b)  $0.01M$  时的离解度。假定  $[HA]$  不会由于离解而减少得很多。

### 5. 证明离解度也可用下式算出

$$\alpha = \frac{K'}{K' + [H^+]}$$

### 6. 试计算醋酸在 (a) pH 3.0, (b) pH 4.0, (c) pH 4.76 时的离解度。

7. 导电性测定表明,  $0.1M$  的丙酸 ( $CH_3CH_2COOH$ ) 溶液在  $25^\circ C$  离解达 1.16%。试计算丙酸的 (a) 离解常数, (b)  $pK'$ 。

### 8. (a) 试计算血浆在 pH 7.4 时 $[HCO_3^-]/[H_2CO_3]$ 之比值。(见表 2-7)

- (b) 试计算血浆中  $[\text{HPO}_4^{2-}]/[\text{H}_2\text{PO}_4^-]$  之比值。
- (c) 在一个封闭的无气体的瓶里,这两个共轭酸碱对中哪一个是血浆样品里更有效的缓冲剂?
9. 肌肉细胞内的 pH 是 6.8。试计算细胞内  $[\text{H}_2\text{PO}_4^-]/[\text{HPO}_4^{2-}]$  的比值。磷酸的二级离解常数是  $6.31 \times 10^{-8} \text{ M}$ 。
10. (a) 如果在 pH 为限速因素的情况下鉴定尿素酶,为了将尿素酶的催化作用精确地减低 50%,必须加多少体积的 0.10 N HCl 到 20.0 毫升 pH 为 6.5 含有尿素酶的 0.04 M 磷酸盐缓冲剂中去?
- (b) 在这种溶液中氢离子浓度将是多少?(用图 2-9 中的数据;尿素酶的缓冲能力忽略不计。)
11. 试计算 0.01 M 的  $\text{H}_2\text{CO}_3$  溶液的 (a) pH, (b)  $\text{CO}_3^{2-}$  离子的浓度。
12. 在 11 题答案的基础上,试就  $\text{H}_2\text{A}$  类型的酸  $\text{A}^{2-}$  离子浓度与  $\text{pK}'_2$  的关系作出概括。
13. 你有 0.1 N NaOH 和 0.1 N  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 醋酸 ( $\text{pK}' = 4.76$ ), 乳酸 ( $\text{pK}' = 3.86$ ), 磷酸 ( $\text{pK}' = 7.2$ ) 和氯化铵 ( $\text{pK}' = 9.25$ ) 溶液可资利用。
- (a) 假定上述的溶液不能加水稀释,在一个将会产生酸的酶实验中,你将如何配制一个 pH 基本保持恒定在 5.40 的 50 毫升缓冲介质?
- (b) 在实验过程中,若是 50 毫升缓冲介质中产生 0.1 毫克当量的酸,则如 (a) 部分中所配制的缓冲剂混合物的最终 pH 是多少?
14. 试计算 0.001 M 的甲酸 ( $\text{pK}' = 3.75$ ) 溶液的 pH 到三位有效数值:
- (a) 假定氢离子浓度比甲酸的浓度小很多。
- (b) 假定氢离子浓度不比甲酸的浓度小很多。
15. 对一个  $10^{-3} \text{ M}$  的甲酸溶液重复 14 题的计算。
16. 试计算 0.01 M 醋酸钠溶液的 pH。
17. 试计算 0.1 M 甲酸 400 毫升与 0.1 M 醋酸钠 100 毫升组成的混合物的 (a) pH, (b) 醋酸根离子浓度。这个混合物构成一个含有两种成分的缓冲剂。这样的缓冲剂在实验室中是常用的;此外,细胞和体液常含有两种或更多缓冲体系。
18. 以下平衡涉及柠檬酸的离解,它是  $\text{H}_3\text{A}$  类型的三价酸以及代谢中几种重要的三羧酸之一:

	$\text{pK}'$
$\text{H}_3\text{A} \rightleftharpoons \text{H}^+ + \text{H}_2\text{A}^-$	3.13
$\text{H}_2\text{A}^- \rightleftharpoons \text{H}^+ + \text{HA}^{2-}$	4.76
$\text{HA}^{2-} \rightleftharpoons \text{H}^+ + \text{A}^{3-}$	6.40

试计算 pH 5.0 时,溶液中下列各种形式的每一种的浓度,溶液中酸和它的阴离子形式的总浓度为 0.01 M: (a)  $\text{H}_3\text{A}$ , (b)  $\text{H}_2\text{A}^-$ , (c)  $\text{HA}^{2-}$  和 (d)  $\text{A}^{3-}$ 。

[彭兴华译 任邦哲校]



### 第三章 蛋白质及其生物学功能概述

本章我们将对蛋白质的化学本质及其生物学作一概述。目的是为这一复杂的领域提示方向与介绍必要的术语和概念,以便在随后第四—九章较详尽地讨论蛋白质的结构与功能。

蛋白质是细胞内最丰富的有机分子,占细胞干重的 50% 或更多。每个细胞的各个部份都有蛋白质;因为对于所有的细胞结构和功能蛋白质都是必不可少的。蛋白质有许多种,每一种都有一个不同的生物学功能。再者,绝大多数遗传信息都是以蛋白质表达出来。为此我们也必须对 DNA 和蛋白质结构之间遗传关系的共性,以及突变对蛋白质结构的作用进行研究。蛋白质分子结构及结构与它们的生物学功能和活性的关系是现代生物化学的中心问题。

#### 蛋白质的组成

数以百计的不同的蛋白质已分离成为纯的结晶形式(图 3-1)。所有蛋白质都含有碳、氢、氮和氧,并且几乎都含硫。某些蛋白质还含有其它的成分,特别是磷、铁、锌与铜。

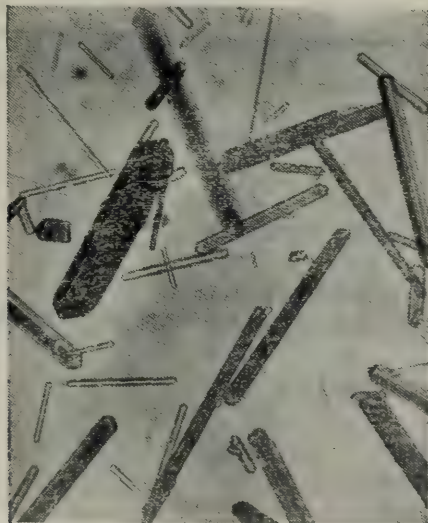


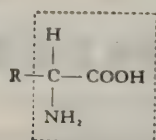
图 3-1 马细胞色素 c (一种在电子传递中发挥作用的蛋白质)的结晶


蛋白质分子量很大,但是通过酸水解它们都可降解成为一群低分子量的简单有机化合物—— $\alpha$ -氨基酸(图 1-3 与 3-2)。这些组成单元分子至少含一个羧基和一个  $\alpha$ -氨基,但它们的 R 或侧链是彼此不同的。通常发现有 20 种不同的  $\alpha$ -氨基酸作为蛋白质的组成单元。(第四章)

在蛋白质中氨基酸残基以共价连接而形成很长的不分支的链。它们通过取代的酰胺

蛋白质中 $\alpha$ -氨基酸的一般结构式。虚线方框部分在  
所有氨基酸是共同的,而R基则是有区别的。

代表性氨基酸的R基



R 基	氨基酸名称
H—	甘氨酸
CH <sub>3</sub> —	丙氨酸
HOCH <sub>2</sub> —	丝氨酸
 —CH <sub>2</sub>	苯丙氨酸

一种四肽的结构

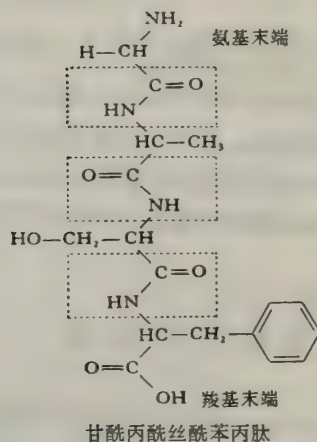


图 3-2 氨基酸、它们的R基与肽的结构。

表 3-1 某些结合蛋白质

类 别	辅 基 成 分	辅基占全重的大约百分率
核蛋白系统		
核糖体	RNA	50-60
烟草斑纹病毒	RNA	5
脂蛋白		
血浆 $\beta_1$ -脂蛋白	磷脂、胆固醇、中性脂肪	79
糖蛋白		
丙种球蛋白	氨基己糖、半乳糖、甘露糖、唾液酸	2
血浆 $\alpha_1$ -酸性糖蛋白	半乳糖、甘露糖、N-乙酰氨基半乳糖, N-乙酰神经氨酸	40
磷蛋白		
酪素(奶)	丝氨酸残基磷脂化	4
血蛋白		
血红蛋白	铁原卟啉	4
细胞色素 c	铁原卟啉	4
过氧化氢酶	铁原卟啉	3.1
黄素蛋白		
琥珀酸脱氢酶	黄素腺二核苷酸	2
D-氨基酸氧化酶	黄素腺二核苷酸	2
金属蛋白		
铁蛋白	Fe(OH) <sub>3</sub>	23
细胞色素氧化酶	Fe 与 Cu	0.3
乙醇脱氢酶	Zn	0.3
黄嘌呤氧化酶	Mo 与 Fe	0.4



键以头对尾的排列而联接起来,这种取代的酰胺键叫作肽键(图 3-2)。肽键由一个氨基酸的羧基和下一个氨基酸的  $\alpha$ -氨基脱去一分子水而成。这些巨分子叫作多肽,它们可能含有数以百计的氨基酸单位。有些蛋白质仅有一条多肽链;另一些蛋白质含有二条或多条多肽链。蛋白质的多肽链并不是长度不定的无规多聚体;每个多肽链都有一定的分子量、化学组成、氨基酸组成单元的固定的排列顺序与三维形状。(第五章)

根据蛋白质的组成,它们分为两大类:单纯的与结合的。单纯蛋白质通过水解仅产生氨基酸,没有其它较大的有机或无机水解产物。它们通常含约 50% 碳、7% 氢、23% 氧、16% 氮及 0—3% 硫。结合蛋白质的水解产物不仅有氨基酸,而且有其它的有机或无机成分。结合蛋白质的非氨基酸部分称为它的辅基。结合蛋白质可以按照辅基的化学性质来分类(表 3-1),即含核酸的核蛋白、含脂类的脂蛋白、以及磷蛋白、金属蛋白和糖蛋白。

### 蛋白质分子的大小

蛋白质的分子量可用物理学方法加以测定,这些测定方法将在第七章予以叙述。某些特性数据列于表 3-2。它们的范围大约是 5,000 至 1,000,000 或更多,而 5,000 是主观任意规定的下限。甚至在同类功能的蛋白质中,我们都提不出统一的大小。例如不同的酶分子量大约可从 12,000 至 1,000,000 以上。蛋白质分子量的上限也只能主观任意地估计,因为如我们将看到的那样,它取决于我们如何确定蛋白质与分子的定义。

表 3-2 某些蛋白质的分子量

蛋 白 质	分 子 量	肽 链 数
胰岛素(牛)	5,700	2
核糖核酸酶 I (牛胰)	12,600	1
溶酶(卵清)	13,900	1
肌红蛋白(马心)	16,900	1
糜蛋白酶原(牛胰)	23,200	1
$\beta$ -乳球蛋白(牛)	35,000	2
血红蛋白(人)	64,500	4
己糖激酶(酵母)	102,000	2
色氨酸合成酶(大肠杆菌)	159,000	4
天冬氨酸转氨甲酰酶(大肠杆菌)	310,000	12
糖原磷酸化酶(牛肝)	370,000	4
谷氨酰胺合成酶(大肠杆菌)	592,000	12
丙酮酸脱氢酶复合体(牛肾)	7,000,000	160
烟草斑纹病毒	40,000,000	2130

从表 3-2 也可看出许多分子量大于 36,000 的蛋白质含有两条或多条多肽链。已知结构的绝大部分蛋白质的单个多肽链含 100—300 个氨基酸残基(分子量 12,000—36,000)。核糖核酸酶、细胞色素 c 与肌红蛋白属于瞭解最多的小分子蛋白质,它们的单个多肽链含 100—155 个氨基酸残基。然而某些蛋白质具有较长的链,诸如血清白蛋白(约 550 个残基)与肌球蛋白(约 1,800 个残基)。

## 蛋白质的构象

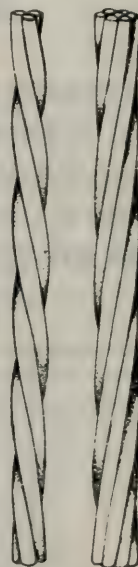
各类蛋白质分子在天然状态都有一个特殊的三维空间形状,叫作它的构象(更精确定义在第六章)。按照它们的构象,蛋白质可分为两大类:纤维状的与球状的(图 3-3)。纤维状蛋白质是由沿一个单轴平行排列的一些多肽链所组成,从而形成长的纤维或薄片。纤维状蛋白质的物理性质是强韧的,不溶于水或稀盐溶液。它们是高等动物结缔组织的基本结构成分,例如肌腱与骨基质的胶原,毛发、角、皮、爪甲和羽毛的 $\alpha$ -角蛋白,以及弹

### 纤维状蛋白质

一个典型的纤维状蛋白质—— $\alpha$ -角蛋白的多肽链主链。二级结构指的是多肽链沿一维空间所形成的规则线圈或之字形排列。



$\alpha$ -螺旋线圈



多个 $\alpha$ -螺旋线圈高度扭卷形成缆索

### 球状蛋白质

多肽链折叠成为一个紧密的球形,这叫三级结构。球形蛋白质多肽链的短段也可以有规则的或之字形二级结构。在低聚蛋白质中多肽链的空间紧靠排列,叫作四级结构。



一个单链球形蛋白质的三级结构 ... 一个多链或低聚的球形蛋白质的四级结构

图 3-3 纤维状与球状蛋白质



性结缔组织的弹性蛋白。另一方面,在球状蛋白质中,多肽链紧紧折叠成紧密的圆形或球形(图 3-3)。绝大多数球状蛋白质是水溶性的。它们在细胞内通常具有活动的或动力学功能。迄今已知的近 2,000 种不同的酶、抗体、若干激素与许多具有转运功能的蛋白质(如血清白蛋白与血红蛋白)几乎全是球状蛋白质。某些蛋白质介乎纤维型与球型之间,它们的长杆样结构类似纤维状蛋白质,而它们在盐溶液中的溶解性又类似球状蛋白质。肌球蛋白与纤维蛋白原就是例子。前者是肌肉的一种重要结构成分,后者是血液凝块的结构成分——纤维蛋白的前身。

通常用以代表蛋白质结构(图 3-3)不同水平的专门术语将在第五章加以更完全与精确地定义。一级结构指的是多肽链的共价骨架与它的氨基酸残基的顺序。二级结构指的是多肽链沿一维空间的规则性循环式排列。在纤维状蛋白质二级结构是特别明显的、多肽链呈伸展构型或纵长的螺旋构型;在球状蛋白质多肽链的节段中也存在二级结构。三级结构指的是多肽链在三维空间如何迂迴盘曲或折叠,以形成球状蛋白质的紧密折叠结构。(图 3-3)

四级结构指的是含有二条或多条多肽链的蛋白质中,各条多肽链如何排列而彼此关联。绝大多数较大的蛋白质都有二条或多条多肽链,在它们之间通常并无共价键(图 3-3)。构象这一笼统的术语往往指的是蛋白质的二级、三级与四级结构复合的通称。(第六章)

具有二条或多条多肽链的蛋白质称为低聚蛋白质;它们的组分肽链称为亚单位或亚基。作为红细胞呼吸色素的血红蛋白,就是一个瞭解较多的低聚蛋白质的例子;它由四条多肽链组成,这些肽链紧紧地装配在一起,成为一个相当稳定的紧密的球形结构,尽管它们彼此之间并无共价键存在。低聚蛋白质所含的肽链通常是偶数,这些肽链的长度与氨基酸顺序可同可异。较小的低聚蛋白质可有 2—12 个亚单位链。

因为低聚蛋白质含两条或多条多肽链,通常这些多肽链并不通过共价键而彼此连接。因此将低聚蛋白质称为“分子”并谈到它们的“分子量”,这可能是 不恰当的或至少是不确切的。然而在绝大多数低聚蛋白质中,这些各自独立的肽链是如此紧密地联系,以致完整粒子在溶液中的行为象一个单一的分子。再者,对低聚蛋白质的生物学功能而言,它们的全部组分亚单位都是必需的。

## 蛋白质的超分子装配

有时一组在功能上联系在一起的蛋白质分子,在细胞内作为一个簇集体或复合体而存在,这种簇集体可以均一的甚至结晶形式分离出来。在功能上相关的巨分子簇集体叫作超分子装置或复合体。脂肪酸合成酶复合体就是一个例子,它含有脂肪酸生物合成必需的七种不同酶各一个分子。这一复合体可以从酵母细胞以均一形式分离出来。最大的超分子蛋白质复合体是病毒,它们是蛋白质与核酸的复合体;某些病毒也含有脂类与金属离子。烟草斑纹病毒(图 3-4)是一个较小的病毒,它的颗粒重量约 4,000 万,其中大约 5% 或 200 万由核糖核酸组成,其余

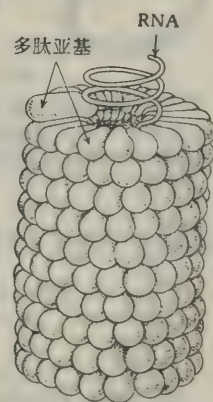


图 3-4 烟草斑纹病毒颗粒部分。一个由 2,200 个多肽链与一分子 RNA 组成的超分子装置。

的 3,800 万是由蛋白质 (2,200 个相同的多肽链) 所组成。然而病毒颗粒行为象一个有一定分子量的单一匀质结构, 因为它们的亚单位成分很紧密地固着在一起。

## 变 性

绝大多数蛋白质仅仅在一个很窄的温度与 pH 范围内保持它们的生物学活性。将可溶性或球状蛋白质暴露于强酸、强碱或高温, 仅仅短时间就可引起它们的绝大多数遭受物理性变化, 这种物理性变化叫作变性。变性最明显的影响就是溶解度降低。因为在这一相对温和处理时, 多肽链骨架的共价键并未裂解, 所以它们的一级结构仍然是完整的。当温度升至 60—70℃ 以上, 绝大部分球状蛋白质就会变性。卵蛋白煮后形成不溶的白色凝块, 就是蛋白质变性的一个最普通的例子。但是变性最重要的后果是蛋白质通常丧失它特殊的生物学活性, 例如, 加热常常破坏酶的催化能力。

变性就是球状蛋白质分子的多肽链的特殊天然折迭结构的展开 (图 3-5)。当热变化使天然折迭结构成为非盘绕或不曲卷的无规线团时, 蛋白质就丧失它的生物学活性。虽然每一种蛋白质在生物合成中都有固定的氨基酸组成与顺序, 但是氨基酸顺序本身并不直接地赋予蛋白质以生物学功能或活性。然而我们可以看到氨基酸顺序终将决定蛋白质的

生物活性, 因为它通过氨基酸侧链彼此之间以及与溶剂和其它溶质之间的相互作用, 而决定蛋白质分子的天然构型或折叠状态。这一结论是基于这样一个发现, 即天然蛋白质的变性或展开成为无规线圈状的非生物活性的形式, 并不是象过去所推测的那样是属于非可逆的。现已观察到许多这样的情况, 展开的蛋白质分子在试管内可以自发地回复到它的天然生物学活性形式, 这个过程叫作复性 (图 3-5)。假如变性蛋白质是一种酶, 它的催化活性在复性时就恢复了, 并且它所催化反应的特异性并无改变。然而变性蛋白质的复性并不能带来原来蛋白质所没有的任何生物学活性。因此, 这些事实表明多肽链的氨基酸顺序含有规定它的天然折叠构型所需的信息, 并且这一天然构型决定



图 3-5 球状蛋白的变性与复性。在多肽链展开 (由于加热、强酸或尿素处理) 后, 往往可以自发地重新折叠成天然形式。

它的生物学活性。(第六章)

## 蛋白质功能的多样性

蛋白质有许多不同的生物学功能。表 3-3 列出一些有代表性的蛋白质类型, 这是按照功能分类的。酶是最大的一类。已知近 2,000 种不同的酶, 每一种催化一种不同的化学反应。酶具有非常强大的催化力, 它远远超出人造催化剂的催化能力。它们在功能上是高度特异的。己糖激酶催化三磷酸腺苷 (ATP) 的磷酸根转移至葡萄糖, 这是糖代谢的第一步。另外一些酶使燃料分子脱氢。还有一些其它的酶, 如细胞色素 c 在呼吸过程中将电子转运给分子的氧, 或者象 DNA 聚合酶与氨基酸激活酶参与细胞成分的生物合成。每一



表 3-3 根据生物学功能的蛋白质分类

类 型 与 举 例	存 在 或 功 能
酶类	
己糖激酶	使葡萄糖磷酸化
乳酸脱氢酶	使乳酸脱氢
细胞色素 c	传递电子
DNA 聚合酶	复制与修理 DNA
贮存蛋白类	
卵白蛋白	卵清蛋白
酪蛋白	奶蛋白
铁蛋白	脾脏铁贮存
麸蛋白	麦种子蛋白
玉米蛋白	玉米种子蛋白
运输蛋白类	
血红蛋白	在脊椎动物血液中运输 $O_2$
血蓝蛋白	在某些无脊椎动物血中运输 $O_2$
肌球蛋白	在肌肉中运输 $O_2$
血清白蛋白	在血中运输脂肪酸
$\beta_1$ -脂蛋白	在血中运输脂类
铁结合球蛋白	在血中运输铁
血浆铜蛋白	在血中运输铜
收缩蛋白类	
肌凝蛋白	肌纤维中的粗丝
肌动蛋白	肌纤维中的细丝
鞭毛运动蛋白	纤毛与鞭毛
脊椎动物血中的防御蛋白质类	
抗体	与外源性蛋白质形成复合物
补体	与某些抗原-抗体系统形成复合物
纤维蛋白原	血液凝固过程中的纤维蛋白的前身
凝血酶	凝固机制的成分
毒素类	
肉毒杆菌毒素	引起细菌性食物中毒
白喉毒素	细菌毒素
蛇毒	水解磷酸甘油酯的酶
蓖麻毒	蓖麻子毒蛋白
棉子毒	棉子毒性蛋白
激素类	
胰岛素	调节葡萄糖代谢
促肾上腺皮质激素	调节肾上腺皮质激素合成
生长激素	刺激骨骼生长
结构蛋白类	
病毒外壳蛋白	包绕核酸
糖蛋白	细胞外衣与壁
$\alpha$ -角蛋白	皮肤、羽毛、甲爪、蹄
硬蛋白	昆虫的外骨骼
丝纤蛋白	茧丝、蜘蛛网
胶原	纤维结缔组织(肌腱、骨、软骨)
弹性蛋白	弹性结缔组织(韧带)
粘蛋白	粘膜分泌物,滑膜液

种酶分子含有一个活性部位,在催化过程中,它的特殊底物结合于其上。许多酶是单一多肽链,但有些酶含有二条或多条多肽链。某些酶进一步特化,除它们的催化活性外,还具有调节功能,这些酶叫作调节酶或别位酶。实际上所有酶都是如上所述的球状蛋白质。酶如何催化化学反应,这是现代生物化学的一个主要课题。

另一类主要蛋白质具有贮存氨基酸作为营养物与为发育的胚胎提供组成单元的功能,如卵白的卵清蛋白、乳汁的酪蛋白、小麦种子的麦醇溶蛋白。

有些蛋白质具有转运功能,它们能结合特殊类型分子,并通过血液而转运之。血清白蛋白紧紧地结合游离脂肪酸,从而在脊椎动物的脂肪组织与其它组织或器官之间转运这些分子。血浆的脂蛋白在小肠、肝和脂肪组织之间转运脂类。脊椎动物红细胞的血红蛋白将氧由肺转运至组织。无脊椎动物具有其它类型的携氧蛋白分子,诸如血蓝蛋白。

另一些类型的蛋白质作为收缩与运动系统的基本成分而发挥作用。肌动蛋白(肌纤维蛋白)与肌球蛋白(肌凝蛋白)是骨骼肌收缩系统二个主要的蛋白质成分。肌动蛋白是一条长丝状的蛋白质,它由许多球形多肽链象一串念珠排列而成;肌球蛋白是一个长杆样分子,由二股螺旋互相缠绕的多肽链所组成(第二十七章)。在肌肉内,这些蛋白质平行排列,在收缩时相互滑行。

有些蛋白质具有保护或防御功能。血液蛋白质凝血酶与纤维蛋白元参与血液凝固,从而防止脊椎动物血管系统失血。但是最重要的保护蛋白质是抗体或免疫球蛋白,它们能与偶然进入一定的脊椎动物血液或组织的外来蛋白质及其它物质相结合,并从而中和之。实际上,抗体的研究已经得到这样的结论:每种机体都有它自己特异的一套蛋白质分子。

另一类蛋白质是毒素,很少量就可使高等动物产生强烈毒性反应。这类蛋白质包括蓖麻子的蓖麻蛋白、棉子的棉子毒、白喉毒素与厌氧性肉毒杆菌的毒素,后者引起某些类型的食物中毒。

最有趣的蛋白质之一是起激素作用的蛋白质,诸如垂体前叶分泌的生长激素。胰岛素是胰脏某些特化细胞分泌的,它是调节葡萄糖代谢的一种激素。人缺乏胰岛素就会引起糖尿病。

还有另一类作为结构成分的蛋白质。在脊椎动物里,纤维状蛋白质胶原是结缔组织与骨骼的主要的细胞外结构蛋白质。胶原纤维通过形成结构的连续性,也有助于将一群细胞结合在一起而构成一种组织。在脊椎动物里,黄色弹性组织的弹性蛋白与上面提到的 $\alpha$ -角蛋白也是纤维状蛋白质。软骨不仅含有胶原,而且含有糖蛋白;糖蛋白赋予粘膜分泌物以及脊椎动物关节滑液以滑润性质。

除了这几大类蛋白质外,其它蛋白质具有一些异乎寻常的功能。蜘蛛与蚕分泌一种浓的蛋白质溶液,这种蛋白质叫丝心蛋白;它很快在体外硬化成为具有特别抗张强度的不溶的纤维束,用以形成蜘蛛网或茧。生活在零下南极水中的某些鱼类的血液中含有一种使血液不冻结的蛋白质,可恰当地称为“抗冻结”蛋白。甜果蛋白是一种具有甜味的蛋白质,它存在于某些水果中;在其变性之后,就不再具有甜味。

令人惊奇的是,全部蛋白质包括具有强烈生物学或毒性作用的蛋白质在内,都由相同的20种氨基酸组成,这些氨基酸本身很少或没有生物学活性或毒性。它的三维空间构型才赋予每种蛋白质以特殊的生物学活性,然而它的构型又是由其多肽链中氨基酸特殊的



顺序决定的(第六章)。

## 抗体与免疫反应；蛋白质的物种特异性

在活机体的许多不同蛋白质中，抗体（或免疫球蛋白）在显示每种机体的特异性方面具有最重要的意义。由于异种的蛋白质或某些其它的巨分子进入，在脊椎动物的血清中与某些细胞表面就出现抗体分子，这种引起抗体产生的异种巨分子叫作抗原。以这种形式产生的特异性抗体分子，可以与引起它产生的抗原结合而形成抗原-抗体复合物(图



图 3-6 抗原-抗体反应

抗原的空白部位是抗原特异性的决定簇。抗体分子的空白部位在结构上与抗原的决定簇部位是互补的。抗体是二价的，但抗原可以是多价的。

\* 原书此处为 precipitin，直译为沉淀素。此处应是 precipitate 为妥，故改译为沉淀物。——译者注

3-6)。这种反应叫作免疫反应，它是免疫学整个领域的基础。通过注入很少量的致病微生物或病毒的某些巨分子成分(即抗原成分)，往往可造成对相应的传染病的免疫。特异性抗体(或免疫球蛋白)应答外来抗原而形成之后，可在血液中持续一个较长的时间。假如致病微生物后来再进入血液或淋巴，这些特异性抗体就可与它的抗原成分相结合，从而灭活或杀死这些致病微生物。免疫反应仅出现在脊椎动物，因此它是生物进化的相当新近的产物。

抗体分子具有结合部位，这些结合部位对引起它们产生的抗原结构特征是特异的，并且是互补的。抗体通常有二个结合部位，从而使互相交错的抗原与抗体分子有可能形成一个三维空间的晶格，因这种晶格最后会从血清中沉淀出来，故将这种抗体称为沉淀素。关于免疫球蛋白的结构与来源将在第三十五章予以详述。

抗体对于引起它们形成的外源性蛋白质是高度专一性的。例如给兔注入鸡卵清蛋白所产生的抗体，就只与鸡卵清蛋白相结合，不与无关蛋白(诸如人血红蛋白)结合。再者，它对天然鸡卵清蛋白的三维空间结构是有专一性的。因此若将清蛋白加热或变性使多肽链展开或将其进行化学改变，那么抗体就不再与它结合。

应用高度专一性的抗原-抗体反应来研究不同种属机体的各种蛋白，已经得出了几个重要的论断。首先，每一种属的在功能上不同的蛋白质引起不同的抗体形成。因此当家兔被马血红蛋白免疫时，所产生的抗体将使马血红蛋白沉淀，通常并不沉淀马的其它蛋白质。

第二个主要的论断是不同种属的同系蛋白在免疫学上是不同的，这具有很大的生物学意义。同系蛋白是指具有相同或类似功能的蛋白质，例如不同种属脊椎动物的血红蛋白。虽然不同哺乳动物的血红蛋白不仅功能上相同，而且分子量大致相等，都有四个铁原子、四个卟啉环与四条多肽链，但是在免疫学上它们是不同的分子。例如以马血红蛋白给家兔免疫所产生的抗体，与马血红蛋白反应最强，而与其它脊椎动物的血红蛋白反应很弱。

第三个重要的论断是抗体专一性反映出系统发生的关系。血缘亲近的种属较疏远的种属的同系蛋白更接近一致(表 3-4)。因此以马血红蛋白使家兔产生的抗体与马血红蛋白反应最强，但也与血缘亲近的种属(如斑马、母牛、猪及其它有蹄动物)的血红蛋白发生较强的反应；但与啮齿动物、鸟类和两栖类的血红蛋白反应甚弱。

表 3-4 抗牛血清白蛋白的兔抗体与不同种别动物血清白蛋白的反应性

	沉淀试验的反应性 (100)
牛	76
绵羊	32
猪	25
猫	16
马	15
人	15
田鼠	14
大鼠	14
狗	9
小鼠	



不同种属的同系蛋白的结构不同,这首先是由抗原-抗体反应揭示的,现已查明这是由于它们的氨基酸顺序不同所致(第五章)。两种生物血缘越亲近,它们的同系蛋白的氨基酸顺序就越趋向一致。因此,同系蛋白的氨基酸顺序可能给我们提供关于不同生物进化及其系统发生关系的有价值的资料。

## 多肽链中顺序的异构现象

在前面(序言中)我们估计所有生物全部的不同类型蛋白质的总数约为  $10^{10}$  至  $10^{12}$ 。如此繁多的不同蛋白质各有它自己的特殊的氨基酸顺序,这能否由仅仅 20 种不同的氨基酸所构成呢?单从数学上看,这个问题是可以回答的。一个含两个氨基酸 A 与 B 的二肽,就可能有二个顺序异构体,即 A—B 和 B—A。一个含三个不同氨基酸的三肽,这三个氨基酸就可能有六个顺序排列: A—B—C, A—C—B, B—A—C, B—C—A, C—A—B 与 C—B—A。根据排列理论,不同事物可能的顺序排列数的通式一般是以  $n!$  ( $n$  阶乘积)来表示,此处  $n$  是不同事物的数目。一个含四个不同氨基酸的四肽,就可能有  $4! = 4 \times 3 \times 2 \times 1 = 24$  种不同的顺序。对于一条含 20 个不同氨基酸的多肽,其中每种氨基酸仅仅出现一次,可能的顺序排列数是  $20!$  或  $20 \times 19 \times 18 \times 17 \times 16 \times \cdots$ ,这就得出一个惊人的数目约  $2 \times 10^{18}$ 。但是这仅是一个小的多肽链(分子量约 2,600),其中每种氨基酸只出现一次。对于分子量 34,000 的蛋白质,若含 12 种不同氨基酸,且每种氨基酸数目均等,那就可能有  $10^{300}$  个顺序异构体。正如 26 个英文字母可以用来排成为数浩瀚的文字一样,20 个不同氨基酸可能用以组成几乎无数的不同的蛋白质。弄清不同蛋白质的氨基酸顺序,阐明每个顺序与蛋白质特性和功能以及生物系统发生的关系,这些都是当代生物化学的主要任务。

## 蛋白质中氨基酸顺序的遗传密码

由于蛋白质的结构与功能归根到底是它们的氨基酸顺序的反映,因此没有基因与蛋白质之间分子关系的本质的起码知识,我们就难以讨论蛋白质及其生物学活性。这些关系将在第四篇更详尽地讨论,它们提供了对不同物种的蛋白质的比较生物化学与蛋白质分子的进化的深入了解。遗传信息贮存在染色体的信息巨分子脱氧核糖核酸(DNA)之中。这种信息指令每个细胞按照分子遗传的中心程序产生一种蛋白质的特征性结构;也就是说,遗传信息遵循  $\text{DNA} \rightarrow \text{RNA} \rightarrow \text{蛋白质}$  的方向传递。

在每种蛋白质多肽链中,氨基酸的顺序归根到底是由脱氧核糖核酸(DNA)的核苷酸残基顺序所规定或编码的。规定一条完整多肽链的 DNA 分子节段称为作用子(顺反子)或基因。在 DNA 中,每三个相继的核苷酸残基叫作一个密码三联体,每个密码三联体编码一个氨基酸。然而基因正常是保存在染色体中,在核糖体进行蛋白质生物合成时,它并不直接作为密码模板。而是基因中的遗传信息首先通过酶的作用转录而成特殊类型的核糖核酸,后者称为信使核糖核酸(mRNA),它的核苷酸顺序与基因的 DNA 的核苷酸顺序是互补的。mRNA 中的密码三联体(或密码子)与 DNA 中的密码三联体也是互补的,前者作为直接模板,并在核糖体进行蛋白质生物合成时提供规定氨基酸顺序的遗传

信息。

DNA 的核苷酸顺序、互补的 RNA 的核苷酸顺序与它们编码产生的多肽链的氨基酸顺序之间的编码关系,可以用图解方式说明于图 3-7。DNA 的密码三联体顺序以直线或相继的方式相对应;也就是说,DNA 通过 RNA 中间模板而与它编码的多肽链的氨基酸顺序并行。

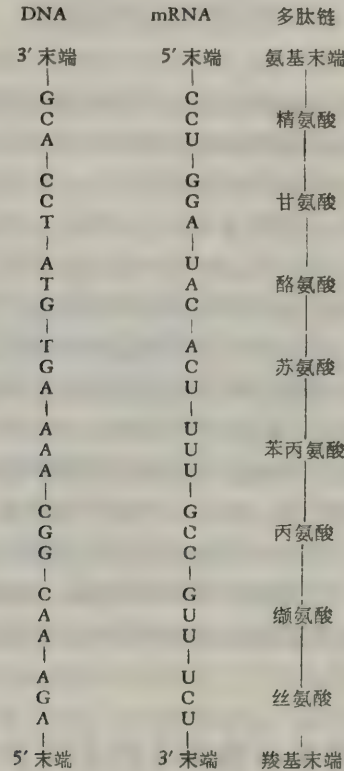


图 3-7 DNA、mRNA 的核苷酸顺序与多肽链的氨基酸顺序之间的并行关系。DNA 的核苷酸单元三联体通过 RNA 的中间形成而决定蛋白质的氨基酸顺序;RNA 的核苷酸三联体(密码子)与 DNA 的核苷酸三联体是相对应的。图中英文字母表示 DNA 与 RNA 的核苷酸残基的特殊碱基成分: A 腺嘌呤, T 胸腺嘧啶, G 鸟嘌呤, C 胞嘧啶, U 尿嘧啶。

## 突 变

有时编码一个既定蛋白质的基因发生化学改变,这种改变可以是某些物理作用例如 X 线照射或放射活性作用的结果,也可以是某些化学因素所致。它们使为一个氨基酸残基编码的三联体里三个碱基中的一个发生化学改变,或缺失一个,有时插进一个额外的核苷酸。结果 DNA 中密码三联体的正常连续的或无逗点的顺序发生变化,从而使 mRNA 的核苷酸顺序也发生相应的变化,因此编码出一个变异的多肽链。在一个异常的多肽链里,它的特殊顺序中可能有一个或多个氨基酸残基被其它氨基酸所取代,结果可能引起生物学功能缺陷。对突变引起的变异蛋白质的实验性研究具有重大意义。因为通过这种研究,首先可以揭示在一条多肽链中哪些氨基酸残基对于蛋白质的结构与功能是必不可少



的。(第六章与第八章)

以这个蛋白质结构与生物学提要为指导,现在我们可以着手对蛋白质结构进行更详尽的探讨。

## 摘 要

蛋白质是由一条或多条多肽链所组成,每条多肽链由许多氨基酸残基通过肽键共价地连接组成。各种蛋白质的分子量是不同的,从大约 5,000 至 1,000,000 或更多。所有蛋白质不管它的功能或物种来源如何,都是由基本的 20 种氨基酸所组成,这些氨基酸按照各种特殊顺序进行排列。单纯蛋白质水解时仅仅产生  $\alpha$ -氨基酸,而结合蛋白质还含有金属或有机的辅基。蛋白质可按照它们的三维空间构型进行分类。纤维状蛋白质呈棒状或片状,它们具有平行而相对伸展的多肽链;它们是不溶于水的,并作为结构成分而存在。球状蛋白质具有紧密折叠的多肽链,呈圆形或球形;它们具有动力学功能。

蛋白质的一级结构是其特殊的氨基酸顺序。二级结构在纤维状蛋白质是多肽链沿着单一长轴伸展或螺旋排列。三级结构指的是多肽链形成球状蛋白质的三维折叠。在含有二个或多个多肽链的低聚蛋白质中,四级结构指的是彼此独立的多肽链如何簇集在一起。归根到底,氨基酸的顺序决定蛋白质分子的三维空间构型。强酸、强碱、高温或其它作用力,都可使蛋白质变性或展开,但肽链骨架并未裂解。变性引起蛋白质丧失它们的生物学活性;但有时变性是可逆的。

蛋白质行使许多不同的功能:作为催化剂、作为结构成分、作为收缩系统的基本成分、作为营养贮存、作为转运载体、作为激素、作为毒素与作为防御因子。最后一类是免疫球蛋白或抗体,它们是脊椎动物在抗原刺激下形成的,而抗原就是异种物质。抗原-抗体专一性研究已经得到这样一个结论:不同种属的同系蛋白具有种属特异性。在蛋白质生物合成时,它的氨基酸顺序是由 RNA 的核苷酸连续三联体的并列顺序规定的,而 RNA 的核苷酸顺序与 DNA 的核苷酸顺序是互补的。为一条多肽链编码的 DNA 节段称为一个基因。

## 参 考 文 献

蛋白质生物化学更专门的问题的参考文献列在第四章的末尾。

### 书籍

- Davis, B. D., R. Dulbecco, H. N. Eisen, H. S. Ginsberg, and W. B. Wood, Jr.: *Principles of Microbiology and Immunology*, 2d ed., Harper & Row, New York, 1973. A textbook that includes an excellent account of the immune response and the biology of the antigen-antibody reaction.
- Neurath, H.: *The Proteins*, 3d ed., vols. 1—4, Academic, New York, 1963—1966. Authoritative and comprehensive monograph.
- Watson, J. D.: *Molecular Biology of the Gene*. 3d ed., Benjamin, Menlo Park, Calif., 1975. Elementary account of the genetic background of protein synthesis.

[贺石林译 任邦哲校]

## 第四章 蛋白质的结构单位——氨基酸

现在我们将比较详细地考虑氨基酸的物理和化学性质，因为它们是蛋白质结构的基本单位，决定蛋白质的许多重要性质。甘氨酸是从蛋白质的水解产物中分离出来的第一个氨基酸，是 H. Braconnot 1820 年从明胶中获得的。在蛋白质中常见的 20 种氨基酸，以苏氨酸发现最晚，是 W. C. Rose 于 1935 年首先从纤维蛋白水解产物中分离出来的。除发现作为蛋白质的基本单位的 20 种氨基酸外，许多生物学上附带出现的氨基酸，在细胞中具有其它功能。

虽然在氨基酸的结构、合成、光学性质以及化学反应等方面较重要的资料出自早期多年的研究，但全面理解氨基酸在决定蛋白质结构中所起作用，还是来自近二十年。

### 蛋白质中常见的氨基酸

图 4-1 所示为在蛋白质中通常发现的 20 种  $\alpha$ -氨基酸，亦称标准氨基酸的一般结构式。除脯氨酸外，全部氨基酸在  $\alpha$ -碳原子上都有一个游离羧基和一个游离未取代的氨基作为共同的特点。它们相互之间的差别，在于它们的特殊侧链结构，即所谓 R 基团。

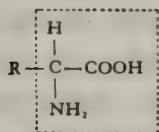


图 4-1 在蛋白质中存在的  $\alpha$ -氨基酸的一般结构式。方框部分是所有  $\alpha$ -氨基酸所共同的。

根据 R 基团性质，提出氨基酸各种不同分类方法。但最有意义的是根据 R 基团的极性分类。主要可分四类：那些具有 (1) 非极性或疏水性的 R 基团；(2) 中性(无电荷)极性的 R 基团；(3) 带正电荷的 R 基团；和 (4) 带负电荷的 R 基团(细胞内的 pH 范围在 6.0—7.0)。在任何一类氨基酸里，R 基团的大小、形状和性质等，都有相当大的差异。后面我们将看到，这种氨基酸的分类方法，可能与在蛋白质中发现的不同氨基酸遗传密码子有关联。

通常以三个字母符号表示氨基酸，但是也可采用一套单个字母符号，便于对比展示同种蛋白质的氨基酸顺序。(表 4-1)

#### 具有非极性(疏水性)R 基团的氨基酸

图 4-2 列出 8 个具有非极性 R 基团的氨基酸结构式、实体模型以及它们的符号。这一族包括 R 为脂肪族烃基的 5 种氨基酸(丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸和脯氨酸)，两种有芳香环的氨基酸(苯丙氨酸和色氨酸)和一种含硫氨基酸(蛋氨酸)。此类氨基酸在水中的溶解度比具有极性 R 基团氨基酸小。其中疏水性最小的是丙氨酸，它接近于非极性氨基酸和那些具有无电荷极性 R 基团的氨基酸之间的边界线上。(见下面)

脯氨酸与其它所有氨基酸不同，实际是一个  $\alpha$ -亚氨酸；它亦可认作是一种  $\alpha$ -氨基酸，它的 R 基团就是氨基上的取代物。



表 4-1 氨基酸符号

氨基酸	三个字母符号	一个字母符号
丙氨酸	Ala	A
精氨酸	Arg	R
天冬酰胺	Asn	N
天冬氨酸	Asp	D
天冬酰胺+/或天冬氨酸	Asx	B
半胱氨酸	Cys	C
谷氨酰胺	Gln	Q
谷氨酸	Glu	E
谷氨酰胺+/或谷氨酸	Glx	Z
甘氨酸	Gly	G
组氨酸	His	H
异亮氨酸	Ile	I
亮氨酸	Leu	L
赖氨酸	Lys	K
蛋氨酸	Met	M
苯丙氨酸	Phe	F
脯氨酸	Pro	P
丝氨酸	Ser	S
苏氨酸	Thr	T
色氨酸	Trp	W
酪氨酸	Tyr	Y
缬氨酸	Val	V

### 具有无电荷的极性 R 基团的氨基酸

这些氨基酸(图 4-3)比具有非极性 R 基团的氨基酸较易溶于水。它们的 R 基团含中性(无电荷)极性功能基团,此基团能同水形成氢键。丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸的极性是由它们的羟基所提供的;天冬酰胺和谷氨酰胺的极性是它们的酰胺基所引起,而半胱氨酸的极性是它的巯基( $-SH$ )所引起的。甘氨酸正好在此类的边界线上,常常被划分为非极性氨基酸(参看上面),但它的 R 基团是单一氢原子,对  $\alpha$ -氨基和  $\alpha$ -羧基的高度极性影响太小。

天冬酰胺和谷氨酰胺是天冬氨酸和谷氨酸的酰胺(见下面),因为这些氨基酸容易被酸和碱水解成天冬氨酸和谷氨酸,所以当酰胺形式的含量未知时,常用 Asx 和 Glx 两种符号标志这些化学上相关的氨基酸对。

半胱氨酸和酪氨酸具有这一类氨基酸中的极性最大的取代基,分别为巯基和酚羟基。虽然这些基团在 pH7.0 时只能轻度电离,但它们远较此类氨基酸中其它氨基酸的 R 基团更容易经电离而失去质子。半胱氨酸常常以它的氧化形式胱氨酸出现在蛋白质中,在胱氨酸中,两个分子半胱氨酸的巯基已被氧化成二巯基,在它们之间提供一个共价交联键。胱氨酸的结构式已在前面提到。

### R 基团带正电荷(碱性)的氨基酸

在 pH7.0 时, R 基团带有一个净正电荷的碱性氨基酸(图 4-4)都有 6 个碳原子。它

R 基	R 基	R 基
丙氨酸 Ala A 分子量 89	$\text{CH}_3$ —	$\begin{array}{c} \text{H} \\   \\ \text{C} - \text{COO}^- \\   \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$
缬氨酸 Val V 分子量 117	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\   \\ \text{CH} - \\   \\ \text{CH}_3 \end{array}$ —	$\begin{array}{c} \text{H} \\   \\ \text{C} - \text{COO}^- \\   \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$
亮氨酸 Leu L 分子量 131	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\   \\ \text{CH} - \text{CH}_2 - \\   \\ \text{CH}_3 \end{array}$ —	$\begin{array}{c} \text{H} \\   \\ \text{C} - \text{COO}^- \\   \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$
异亮氨酸 Ile I 分子量 131	$\text{CH}_3 - \text{CH}_2 - \text{CH} - \\   \\ \text{CH}_3$ —	$\begin{array}{c} \text{H} \\   \\ \text{C} - \text{COO}^- \\   \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$
脯氨酸 Pro P 分子量 115		$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\   \\ \text{C} - \text{H} \end{array}$
苯丙氨酸 Phe F 分子量 165		$\begin{array}{c} \text{H} \\   \\ \text{C} - \text{COO}^- \\   \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$
色氨酸 Trp W 分子量 204		$\begin{array}{c} \text{H} \\   \\ \text{C} - \text{COO}^- \\   \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$
蛋氨酸 Met M 分子量 149	$\text{CH}_3 - \text{S} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 -$	$\begin{array}{c} \text{H} \\   \\ \text{C} - \text{COO}^- \\   \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$

图 4-2 具有非极性 R 基团的氨基酸。同时列出三个字母符号和一个字母符号,以及分子量。氨基酸都以在 pH 6.0—7.0 时占优势的离解形式表示。

们包括赖氨酸,在它的脂肪族链的  $\epsilon$  位置上带有正电荷氨基;精氨酸则带有一个正电荷的胍基,以及组氨酸含有弱碱性咪唑功能基。组氨酸就其性质看来属于边缘氨基酸。在 pH 6.0 时,50% 多一点的组氨酸分子具有一个质子化了的、带正电荷的 R 基团,但在 pH 7.0 时,带正电荷者低于 10%,这是 R 基的  $pK'$  值接近于 7.0 的唯一氨基酸。

### R 基团带负电荷(酸性)的氨基酸

这一类的两个成员是天冬氨酸和谷氨酸,每一个氨基酸都有一个完全离解的第二羧



基,故在 pH 6.0—7.0 时带负电荷。(图 4-4)

R 基	R 基
甘氨酸 Gly G 分子量 75	$\begin{array}{c} \text{H} \\   \\ \text{H}-\text{C}-\text{COO}^- \\   \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$
丝氨酸 Ser S 分子量 105	$\begin{array}{c} \text{H} \\   \\ \text{HO}-\text{CH}_2-\text{C}-\text{COO}^- \\   \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$
苏氨酸 Thr T 分子量 119	$\begin{array}{c} \text{OH} \\   \\ \text{CH}_3-\text{C}-\text{C}-\text{COO}^- \\   \quad   \\ \text{H} \quad \text{NH}_3^+ \end{array}$
半胱氨酸 Cys C 分子量 121	$\begin{array}{c} \text{H} \\   \\ \text{HS}-\text{CH}_2-\text{C}-\text{COO}^- \\   \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$
酪氨酸 Tyr Y 分子量 181	$\begin{array}{c} \text{H} \\   \\ \text{HO}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_2-\text{C}-\text{COO}^- \\   \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$
天冬酰胺 Asn N 分子量 132	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\   \\ \text{C}-\text{CH}_2-\text{C}-\text{COO}^- \\    \quad   \\ \text{O} \quad \text{NH}_3^+ \end{array}$
谷氨酰胺 Gln Q 分子量 146	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\   \\ \text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}-\text{COO}^- \\    \quad   \\ \text{O} \quad \text{NH}_3^+ \end{array}$

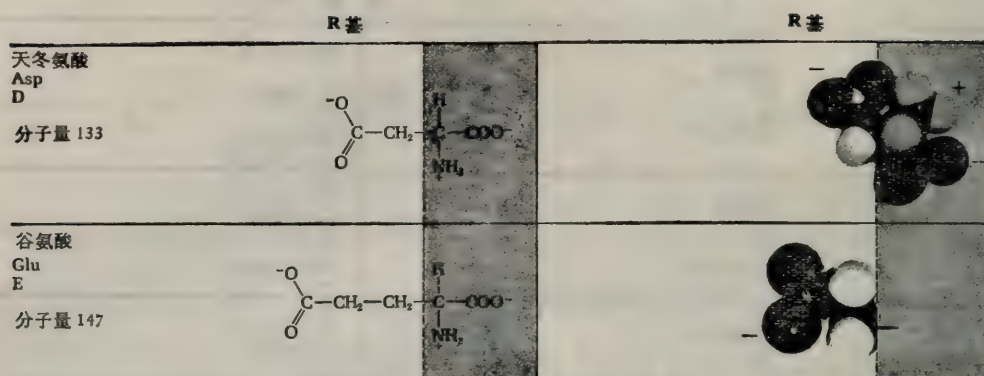
图 4-3 具有无电荷极性 R 基的氨基酸

### 蛋白质中少见的氨基酸

除了常见的 20 种标准氨基酸外,几种比较罕见的其它氨基酸已从水解某些特种蛋白质中分离出来。它们全部都是某些标准氨基酸的衍生物。其中有 4-羟脯氨酸,它是脯氨酸的衍生物,在纤维状蛋白胶原和某些植物蛋白中含量相当丰富(图 4-5)。羟赖氨酸是赖氨酸的 5-羟基衍生物,存在于胶原中。锁链素(desmosine)和异锁链素(isodesmosine)存在于纤维状蛋白弹性硬蛋白中。它们颇为奇特的结构,可以看成是由四个赖氨酸分子通过它们的 R 基团连接成为一个取代了的吡啶环。这种结构可能容许锁链素和异锁链素以放射状的排列与四个肽链连接;弹性硬蛋白与其它纤维状蛋白质不同,它能作双向的伸展。不常见的氨基酸 ε-N-甲基赖氨酸、ε-N-三甲基赖氨酸和甲基组氨酸,这些都是标准氨基酸的甲基衍生物,存在于某些肌蛋白中。

纵然可能在蛋白质中还会发现其它罕见氨基酸,但根据遗传原理,我们能预料它们为

# 酸性氨基酸(在 pH6.0 时带负电荷)



# 碱性氨基酸(在 pH6.0 时带正电荷)

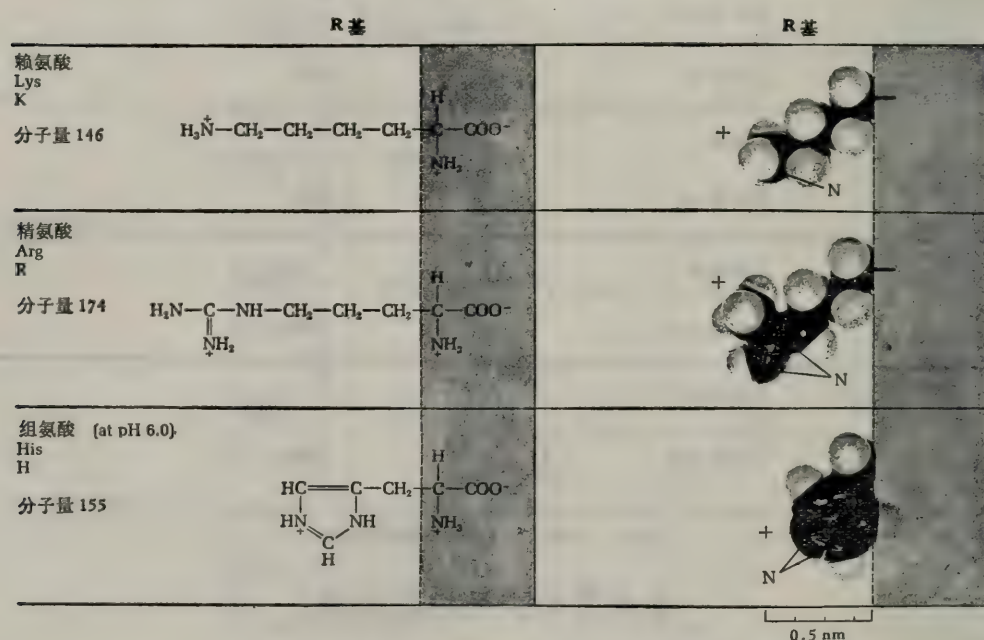


图 4-4 在 pH6.0—7.0 时具有电荷极性基的氨基酸

数必少,将是前所知标准氨基酸的衍生物,并将局限于在特殊类型蛋白质中出现。蛋白质中罕见的氨基酸具有遗传上的特色,因为它们是没有三联密码的。在所有已知情况里,它们都是在它们的母体氨基酸已被嵌进多肽链以后,通过酶促改造而产生的。

## 非蛋白质氨基酸

除了蛋白质中 20 种常见的和几种罕见的氨基酸以外,尚有 150 多种其它氨基酸,已知它们以游离或结合形式存在于生物界,但决非在蛋白质中。在蛋白质中发现的大多数是 L- $\alpha$ -氨基酸衍生物,但也知道有些  $\beta$ -、 $\gamma$ -和  $\delta$ -氨基酸存在。(图 4-6)



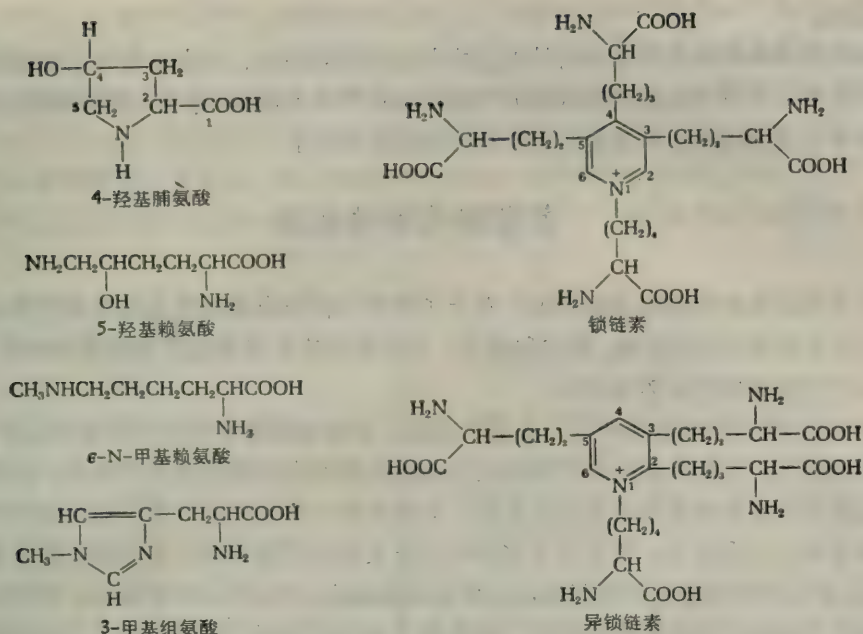


图 4-5 在纤维状蛋白质中存在的某些罕见氨基酸(未离解型)

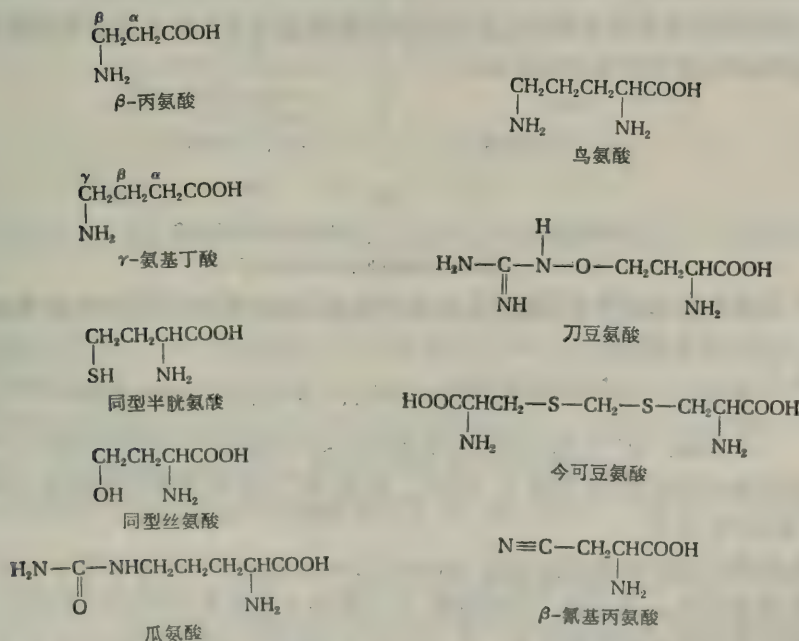


图 4-6 某些蛋白质中没有而自然存在的氨基酸

某些非蛋白质氨基酸在代谢中起着重要前体或中间体的作用。例如  $\beta$ -丙氨酸是泛酸这种维生素的基本单位；同型半胱氨酸和同型丝氨酸是氨基酸代谢的中间产物。瓜氨酸和鸟氨酸是精氨酸合成的中间产物。其它非蛋白质氨基酸则在传递神经冲动中起化学剂作用，如  $\gamma$ -氨基丁酸。某些非蛋白质氨基酸有 D 构型，例如，D-谷氨酸，在许多细菌的细胞壁中发现其含量颇高，D-丙氨酸在某些昆虫的幼虫和蛹中发现，以及 D-丝氨酸在蚯

蚓中发现。

真菌和高等植物含有各种奇特类型的非蛋白质氨基酸，其中有些具有非常奇怪的结构。大多数这些特殊的植物氨基酸的代谢功能目前还不清楚；有些，例如刀豆氨酸、今可豆氨酸和  $\beta$ -氰基氨酸，对某些其它生命形式是有毒的。

## 氨基酸的酸碱性质

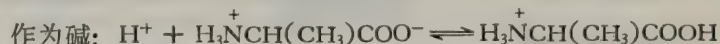
有关氨基酸的酸碱性质的知识，对于了解和分析蛋白质的性质是极端重要的。而且许多有关各种氨基酸的分离、鉴定和定量，以及测定它们在蛋白质中的排列顺序的技术，都是以它们的酸碱性质为基础的。

首先，让我们考察氨基酸的一般离子类型。晶体氨基酸有较高的熔点或分解点，一般在  $200^{\circ}\text{C}$  以上。它们在水中的溶解度比在非极性溶剂中的溶解度要大得多。假若晶态中的氨基酸分子的晶格象盐的高熔点晶格，如氯化钠一样也借助于带有相反电荷的基团之间的静电吸引力而稳定，那么上述这些性质正是我们所预期的。假若氨基酸以非离子形式结晶，则它们将通过更弱的范德瓦尔斯力得到稳定，并且将会有低熔点。根据这一点和许多其它方面的证据已经作出结论：氨基酸在中性水溶液中以偶极离子或兼性离子（图 4-7），而不是以未离解分子形式出现，并且结晶析出。氨基酸在中性溶液中以偶极离子存在，亦可由它们的高电解常数和它们大的偶极矩表现出来。高电常数和偶极矩，又是同一分子上出现阳电荷和阴电荷的反映。



图 4-7 氨基酸的非离解形式和兼性离子形式

当一个结晶的兼性离子氨基酸，比如说丙氨酸，溶解在水中，它既能作为酸（质子给体）也能作为碱（质子受体）：



有这种性质的物质是两性的（希腊文 *amphi*，就是“两”）并称为两性电解质（*ampholyte*），是“两性电解质”的简写。

两性电解质的酸碱行为可以根据 Brönsted-Lowry 酸碱理论作出最简单的公式。一个简单的单氨基单羧基  $\alpha$ -氨基酸，如丙氨酸，在它的充分质子化形式中可看作是二元酸，当用碱完全滴定时它能放出两个质子。用  $\text{NaOH}$  完成的两个阶段滴定过程，可用下列方程描述，这种方程式标明了每一种涉及到的离子形式：

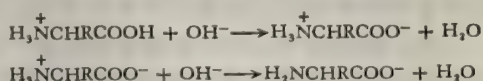


图 4-8 表示丙氨酸的双相滴定曲线，它可与图 2-9 中单纯弱酸的滴定曲线相比较。丙氨酸离解两个阶段的  $\text{pK}'$  值相隔很远，足以形成两个明显分开的段落。每段落有一个中点，



在这点上增加  $\text{OH}^-$  量时只引起 pH 极少变化。两个离解步骤的表观  $pK'$  值能从每阶段的中点测定；其  $pK'_1 = 2.34$ ,  $pK'_2 = 9.69$ 。在 pH 2.34 时，即在第一阶段的中点，质子供体类型 ( $\text{H}_3\text{N}^+\text{CH(R)COOH}$ ) (和质子受体类型 ( $\text{H}_3\text{N}^+\text{CH(R)COO}^-$ )) 以相等克分子浓度存在。在 pH 9.69 时，则有相等克分子浓度  $\text{H}_3\text{N}^+\text{CH(R)COO}^-$  和  $\text{H}_2\text{NCH(R)COO}^-$  存在。双相曲线两个阶段中的每一阶段在数学上能用 Henderson-Hasselbalch 方程式表示，得到非常接近的近似值，这意味着，如已知  $pK'_1$  和  $pK'_2$  数值就能算出任一 pH 值上氨基酸的离子类型的比率。

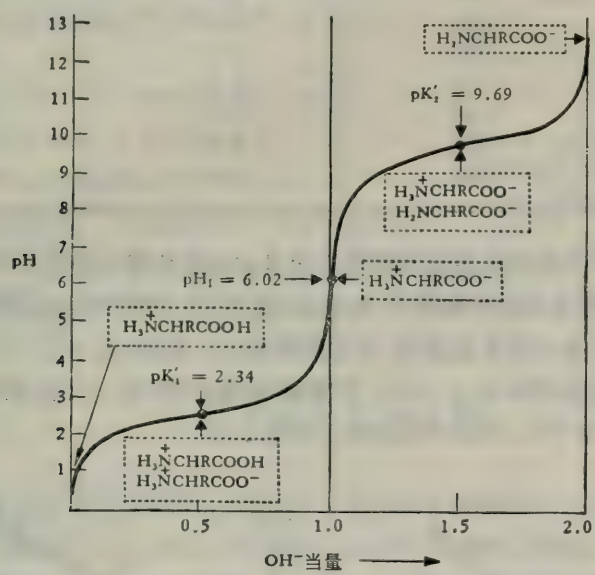


图 4-8 丙氨酸的滴定曲线。在滴定中每一主要点上占优势的离子形式见虚线方框内；R 是丙氨酸的甲基。

在 pH 6.02 时，丙氨酸滴定曲线上的两个分段之间有一析点。分子在此 pH 不带有净电荷，并且在电场中它将不能移动。这就是等电点 pH (用  $\text{pH}_I$  符号表示)，它是  $pK'_1$  和  $pK'_2$  的算术平均值，即  $\text{pH}_I = 1/2 (pK'_1 + pK'_2)$ 。就大多数用处而言，这些关系是足够准确的。然而少而有限度的不带电荷的形式 ( $\text{H}_2\text{NCH(R)COOH}$ ) 也与带电荷的形式处于平衡状态而存在。全部单氨基单羧基氨基酸，基本上都表现了相同的行为。

表 4-2 中列出了某些氨基酸的离解基团的  $pK'$  值。根据这些数据，可归纳成为重要的几条：

1. 单氨基单羧基氨基酸的  $\alpha$ -羧基，与相应的脂肪族酸如醋酸 ( $pK' = 4.76$ ) 羧基比较，是一种较强的酸，其酸性的加强是由于有吸取电子的  $\alpha$ -胺基存在，以及胺基正电荷存在能产生一个强的电场效应，因而增加羧基上的氢离解成质子的倾向。
2. 与相应的脂肪族胺的氨基相比，单氨基单羧基氨基酸的  $\alpha$ -氨基是一种较强的酸 (或较弱的碱)。
3. 一切含有无电荷 R 基团的单氨基单羧基氨基酸，都有几乎等同的  $pK'_1$  值和  $pK'_2$  值。
4. 在生理的 pH 范围内 (即 pH 6.0—8.0)，任何单氨基单羧基氨基酸都没有明显的缓冲能力。但在接近其  $pK'$  值区域，即 pH 1.3—3.3 和 pH 8.6—10.6，则显示出缓冲能

表 4-2 某些氨基酸在 25°C 时离解基团的  $pK'$  值

氨基酸	$pK'_1(\alpha\text{-COOH})$	$pK'_2(\alpha\text{-NH}_3^+)$	$pK'_R(\text{R 基团})$
甘氨酸	2.34	9.6	
丙氨酸	2.34	9.69	
亮氨酸	2.36	9.60	
丝氨酸	2.21	9.15	
苏氨酸	2.63	10.13	
谷氨酰胺	2.17	9.13	
天冬氨酸	2.09	9.82	3.86
谷氨酸	2.19	9.67	4.25
组氨酸	1.82	9.17	6.0
半胱氨酸	1.71	10.78	8.33
酪氨酸	2.20	9.11	10.07
赖氨酸	2.18	8.95	10.53
精氨酸	2.17	9.04	12.48

力。而在 pH 6—8 内, 仅有组氨酸这一种氨基酸具有明显的缓冲能力。

5. 天冬氨酸的  $\beta$ -羧基和谷氨酸的  $\gamma$ -羧基, 虽然在 pH 7.0 时能完全离解, 但其  $pK'$  值比  $\alpha$ -羧基的高得多, 几乎与简单的羧酸, 例如醋酸的  $pK'$  值相等。

6. 半胱氨酸的巯基或巯基 ( $-\text{SH}$ ) 和酪氨酸的  $P$ -羟基, 只有很弱的酸性。在 pH 7.0 时, 前者大约离解 8%, 后者大约离解 0.01%。

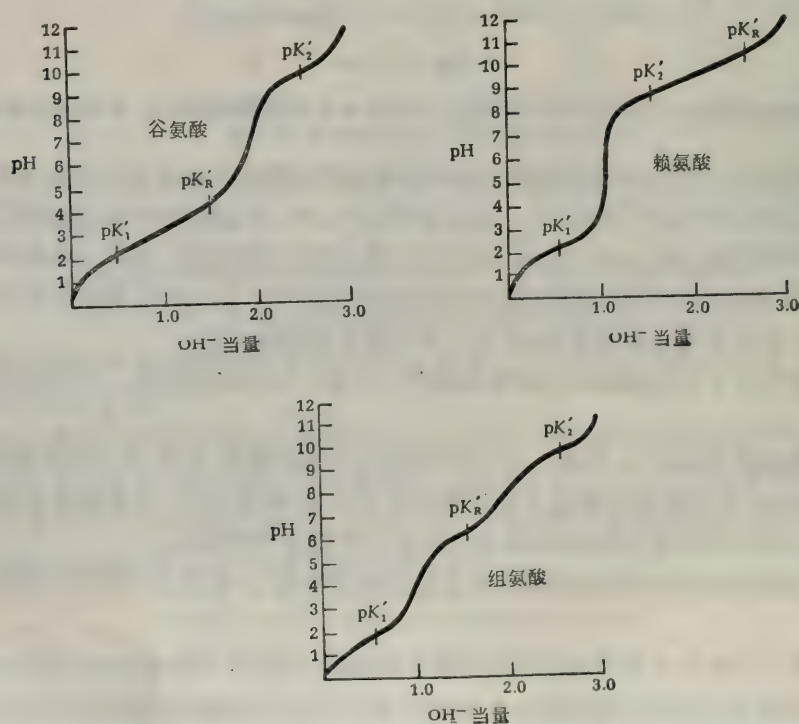


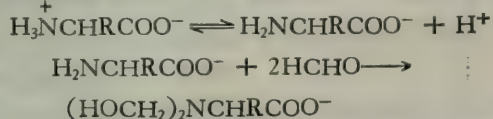
图 4-9 谷氨酸、赖氨酸和组氨酸的滴定曲线。每种氨基酸的 R 基  $pK'$  值均以  $pK'_R$  表示之。



7. 赖氨酸的  $\epsilon$ -氨基和精氨酸的胍基具有强碱性，只能在很高的 pH 才失去质子。在 pH7.0 时，这些氨基酸带有一个净正电荷。

含有可离解的 R 基团的氨基酸，如组氨酸、赖氨酸和谷氨酸等，其滴定曲线是复杂的，因为它相当于 R 基团离解的曲线与  $\alpha$ -氨基和  $\alpha$ -羧基的曲线的组合（图 4-9）。

过量的甲醛容易同氨基酸的游离的即非质子化的氨基结合形成羟甲基衍生物。此反应能使等电点的氨基酸从其兼性离子型的  $\text{H}_3\text{N}^+$ -基上失去一个质子：



上式中释出的质子，可以直接用 NaOH 滴定至 pH 8.0 即酚酞的终点（图 4-10）。在有过量甲醛存在下对氨基酸或氨基酸混合物进行滴定（即甲醛滴定），是一种有用的分析方法，当用蛋白水解酶水解蛋白质时，常用此法追踪游离氨基酸的形成。

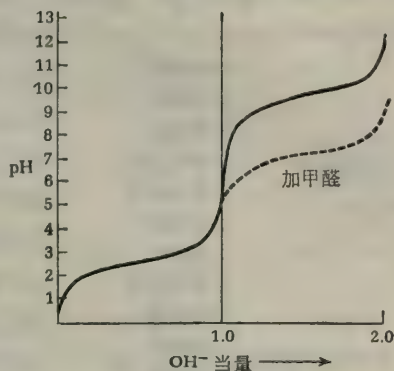


图 4-10 在甲醛存在和不存在的条件下滴定丙氨酸，以表明当甲醛同游离氨基结合时，能滴定的  $\text{H}^+$  就可释放出来。

## 氨基酸的立体化学

在十分温和的条件下水解蛋白质所获得的全部氨基酸都显示光活性，唯独甘氨酸例外；当用偏振计检查时，它们能使平面偏振光的偏振平面发生旋转。凡存在有两种不能重叠互为镜像的结构的所有化合物都显示光活性。这些化合物存在有左手型和右手型，被称为手性化合物（希腊字为 chiral），立体异构现象亦称为手性（handedness），它发生在具有不对称的碳原子（即它们具有四个不同的取代基）的全部化合物中。由于碳原子的  $sp^3$  轨道的四面体性质，四种不同的取代基在碳原子周围的空间就会具有两种不同的排列，产生两种不同的立体异构体或对映体。甘氨酸没有不对称的碳原子。除苏氨酸和异亮氨酸含有两个不对称碳原子外，蛋白质中常见的所有其它氨基酸都只有一个不对称碳原子，任何已知化合物的可能立体异构体的数目是  $2^n$ ， $n$  是不对称碳原子数目。

光活性可用旋光率  $[\alpha]_D^{25}$  作为定量的表示：

$$[\alpha]_D^{25} = \frac{\text{观测的旋光性, 度} \times 100}{\text{光径长度, 分米} \times \text{浓度, 克/100 毫升}}$$

对所有的温度（一般  $25^\circ\text{C}$ ）和光的波长（一般用钠光的 D 线，589.3 毫微米）必须加以规定。表 4-3 列出蛋白质中分离出的  $\alpha$ -氨基酸，在 pH7.0 测定时，某些是右旋的（丙氨酸、异亮氨酸、谷氨酸等），而另一些则是左旋的（色氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸等）。右旋化合物用  $[+]$  号标志，左旋化合物则用  $[-]$  号标志。图 4-11 表明，一种氨基酸的旋光率可随着测定时的 pH 值的变化而变化；一般来说，单氨基单羧基氨基酸在其等电状态时左旋性最大。从表 4-3 的数据我们也能得出结论，一种氨基酸的旋光率与其 R 基团的本质有关。

讨论蛋白质中正常存在氨基酸的立体化学时，最好不象上面那样以旋光率的大小为

表 4-3 从蛋白质中分离的某些氨基酸 (L-立体异构体) 在水溶液中的旋光率

氨基酸	旋光率 $[\alpha]_D^{25}$
L-丙氨酸	+1.8
L-精氨酸	+12.5
L-亮氨酸	-11.0
L-异亮氨酸	+12.4
L-苯丙氨酸	-34.5
L-谷氨酸	+12.0
L-组氨酸	-38.5
L-天冬氨酸	+5.0
L-蛋氨酸	-10.0
L-赖氨酸	+13.5
L-丝氨酸	-7.5
L-脯氨酸	-86.2
L-苏氨酸	-28.5
L-色氨酸	-33.7
L-缬氨酸	+5.6

依据,而是根据环绕不对称碳原子的四面体中四个不同取代基的绝对构型而定。任意选择一个单一母体化合物的光活性中心作为立体异构物的参考标准,所有光活性中心都可

(通过适当反应序列,以一种不会失去光活性的方式进行),在立体化学上与这个母体化合物光活性中心联系起来。这种母体化合物就是三碳糖甘油醛,它是具有一个不对称碳原子的糖类中最小的一个。

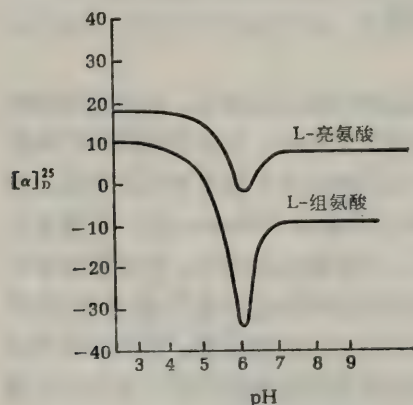


图 4-11 pH 对氨基酸的旋光度的影响

习惯上以 L 和 D (注意使用小的大写字母) 表示甘油醛的两种可能的立体异构体。图 4-12 列出习惯标志立体异构的结构式,图 4-13 列出 L-和 D-丙氨酸与 L-和 D-甘油醛的各自关系。我们可以看到,在丙氨酸的不对称碳原子上的氨基,其空间位置相当于甘油醛的不对称碳原子上的取代羟基。氨基酸的羧基相当于甘油醛的醛基,以及氨基酸 R 基则相当于甘油醛的  $-\text{CH}_2\text{OH}$  基。因此,所有天然氨基酸的立体异构体,在结构上都与甘油醛的两种立体异构体有联系。凡立体化学上与 L-甘油醛有关的所有立

体化学上与 L-甘油醛有关的所有立

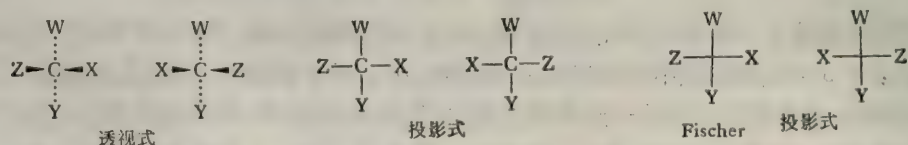


图 4-12 立体异构体的结构式。下面列出一个不对称碳原子的一对立体异构体的三种不同描述。在透视式中,习惯上楔键投射于纸平面上,点键在其后面。通常投影式,水平键假设为投射纸平面上,垂直键在其后面。在这一教科书中,标志立体化学关系所惯用的就是这种方式。然而,没有涉及立体化学构型时,投影式常常并不严格使用。在 Fischer 投影式中,省去了碳符号,并且水平键投射于纸平面上,垂直键在它后面。



体异构体均标记为 L, 而与 D-甘油醛有关的则均标记为 D, 而不考虑这些异构体发生的平面偏振光的旋转方向究竟如何。因此 D 和 L 指的是绝对构型, 而不是旋光方向。已经建议用 (+) 号和 (-) 号来代替表示旋光方向的前缀 d- 和 l-, 以免含糊和混淆。只要已知具有不对称碳原子的化合物的绝对构型, 习惯上都用 D 或 L 来表示它; 而旋光方向就不必标出了。若一种光活性化合物的绝对构型尚未确定, 习惯上这种化合物可以标记 (+) 或 (-) 来标明其旋光方向, 但必须说明测定的条件。全书有关单一不对称碳原子的正确构型, 均以投影式 (图 4-12) 表示, 即画出连接碳原子的四个单键和四个不同的取代基以表示。无论在何处, 凡是四个单键没有确切表明的, 则立体化学也没标明。

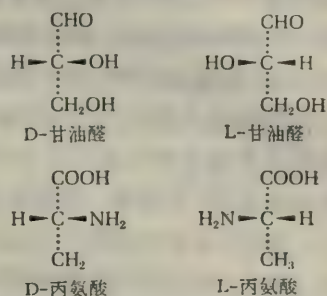


图 4-13 甘油醛和丙氨酸的立体异构型

任何已知化合物的 D 和 L 立体异构物, 例如丙氨酸, 有同一的物理性和同一化学反应性, 但有两种例外情况: (1) 它们旋转平面偏振光的平面到相等程度, 而方向相反; (2) 它们与那些本身也不对称的试剂起反应时的速度不同。作用于氨基酸上的大多数酶, 有不对称的结合位点, 因而能够完全区别氨基酸的 D 和 L 型。

组成蛋白质的所有天然氨基酸, 都属于立体化学的 L 系列。然而, 正如表 4-3 所列出的例子那样, 溶于水中时有些氨基酸是左旋, 有些是右旋。若蛋白质是在适当条件下水解的, 则能保持氨基酸的旋光性而不发生外消旋作用。但是若用简单的有机化学反应在实验室中合成任何一种氨基酸时, 通常得到无光活性产物。称谓外消旋物, 它是由 D-和 L-立体异构体的等克分子混合物所组成, 可用前缀 DL 符号表示之。凡能使不对称碳原子经过一种对称的中间物状态的任何化学反应 (例如在强碱中煮沸) 均可引起有光活性的氨基酸发生外消旋, 亦即转变成 DL 混合物。然而, 当氨基在强酸中加热时, 则不能发生或较少发生外消旋。

具有两个不对称碳原子的氨基酸、苏氨酸和异亮氨酸, 有四种立体异构体。从蛋白质水解产物中分离的苏氨酸, 习惯上以 L 表示; 其镜像就是 D 型。另外两种立体异构体则

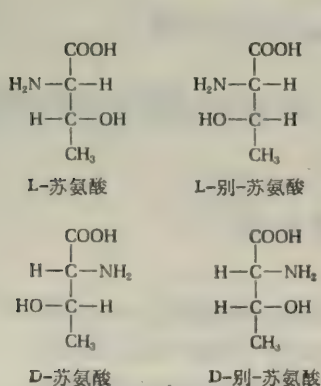


图 4-14 苏氨酸的立体异构体

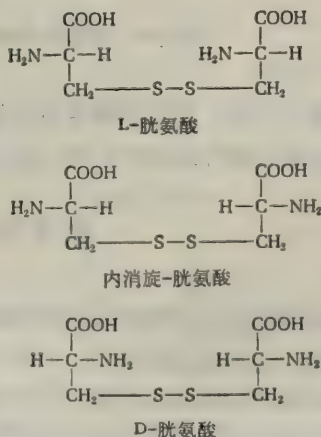


图 4-15 胱氨酸的立体异构体

是非对映立体异构体,或者别型;它们亦互为镜影(图 4-14)。是以  $\alpha$ -碳原子的构型作为决定构型基础的。胱氨酸是半胱氨酸的氧化形式,它含有两个不对称碳原子,每半个分子中含有一个,它不仅可以有 L 和 D 型存在,但还可以是两个不对称碳原子互为镜影而成为另一种异构体存在。这种不存在于生物中的异构体,内部代偿性的异构称为内消旋型(图 4-15)。显然,对于含有一个以上不对称碳原子的化合物命名,会引起概念含糊。用新的立体异构命名系统, Cahn-Ingold-Prelog 会议系统,一般称为 RS 系统,就可避免种种困难。虽然在生物化学方面还没有广泛应用它,但对具有两个以上不对称中心的分子绝对构型的命名来说,它是唯一能提供清楚的途径的。(见参考文献)

虽然,在蛋白质分子中,只存在 L-氨基酸,但在活细胞中,许多不同的 D-氨基酸,以另一种化学形式存在,例如在一些微生物的细胞壁中,或者作为抗菌素的杆菌肽和放线菌素 D 的肽结构的一部分而存在。

## 吸 收 光 谱

虽然蛋白质中存在的 20 种氨基酸都不吸收可见范围的光,但酪氨酸、色氨酸和苯丙氨酸等三种氨基酸却明显地吸收紫外光(图 4-10)。由于大多数蛋白质含有酪氨酸残基,所以在分光光度计中测定它对 280 毫微米波段的光吸收,是测定溶液中蛋白质含量的一种

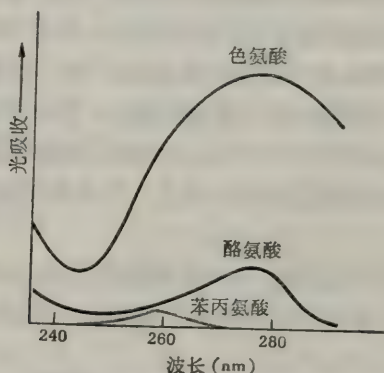


图 4-16 色氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸的紫外吸收光谱。

最迅速而简便的方法。因胱氨酸含有双硫基,在 240 毫微米波段有微弱的光吸收。全部氨基酸都能吸收远紫外线区( $< 220$  毫微米)的光。

## 氨基酸的化学反应

氨基酸有特征性的有机反应,即其官能基的反应,例如羧基和  $\alpha$ -氨基,以及不同侧链中的官能基等。这些反应的知识,对蛋白质化学的几个重要方面非常有用:(1) 鉴定和分析蛋白质水解产物中的氨基酸;(2) 鉴定蛋白质中氨基酸的排列顺序;(3) 鉴定天然蛋白质生物学功能所必需的特殊氨基酸残基;(4) 蛋白质分子中氨基酸残基的化学改变,从而产生它们生物学活性或其它性质的变化和(5) 多肽的化学合成。



## 羧基的反应

所有氨基酸的羧基，都有大家所熟悉的导致酰胺、酯和酰基卤化物等形式的有机反应。这些反应不必在此详述，但氨基酸与乙醇或苯乙醇的酯化作用，常常在化学合成多肽中，用来作为保护氨基酸羧基的一种方法。在研究氨基酸排列顺序中，另一种特别有用的羧基反应，则是用强还原剂氢硼化锂在无水介质中使它还原产生相应的伯醇。(图 4-17)

## 氨基的反应

氨基酸的  $\alpha$ -氨基可以用酰基卤或酸酐处理使它酰化：这个反应在化学合成多肽中，常用来遮盖或保护  $\alpha$ -氨基。常用来达到此目的的一种试剂就是氯甲酸苄酯，产生相应的氨基酸的苄氧羰基衍生物(图 4-18)。若在温和条件下进行酰化，则能保留  $\alpha$ -碳原子立体化学的完整性。但在强烈的条件下，如加热，则可能发生外消旋作用。

一种非常广泛使用的  $\alpha$ -氨基反应，茚三酮反应，能用它作极微量氨基酸的定量测定。一个分子的氨基酸与两个分子的茚三酮一同加热时，则起反应产生一种深颜色的产物(图 4-19)所有带有游离  $\alpha$ -氨基的氨基酸和肽类，在茚三酮反应中皆形成紫色产物，而脯氨酸

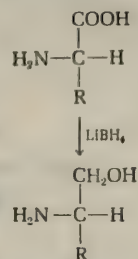


图 4-17 氨基酸羧基的还原反应

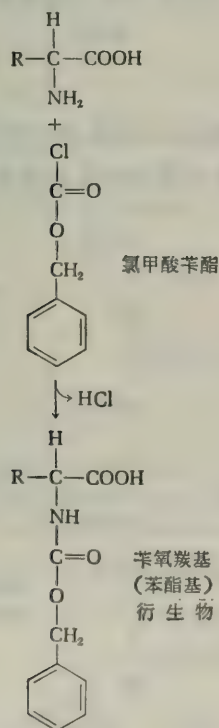


图 4-18 氨基酸的苄氧羰基衍生物的形式

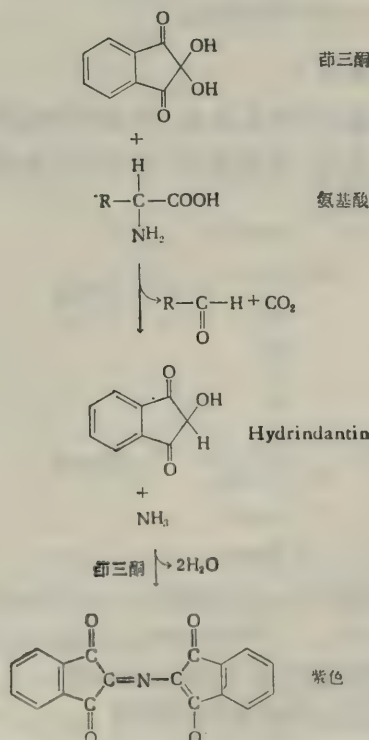


图 4-19 茚三酮反应，这种强烈的氧化剂引起氨基酸氧化脱羧作用。所生成的氨和 hydrindantin 与第二个分子的茚三酮起反应，形成紫色色素，这种色素中，只有氮原子是从氨基酸中来的。

和羟脯氨酸，它的  $\alpha$ -氨基是取代了的，则产生一种特有的黄色衍生物。

氨基酸的  $\alpha$ -氨基与醛类起可逆反应而形成的化合物，称为 Schiff 氏碱（图 4-20）。Schiff 氏碱在涉及酶与底物的氨基或羧基起作用的许多酶促反应中似乎是中间产物。氨基的另一重要反应是与氰酸盐产生氨基甲酰衍生物的反应（图 4-21）。曾用这种反应去改变镰状细胞血红蛋白的性质，使它更加近似于正常成人血红蛋白。

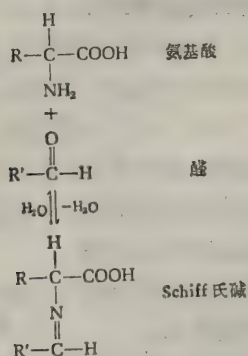


图 4-20 Schiff 氏碱的形成

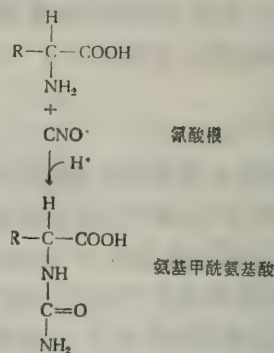


图 4-21 氨基酸与氰酸盐的反应

除了氨基的这些反应之外，还有几种对于标记在多肽链上氨基是游离(或未结合)的那个末端氨基酸残基最有用的反应。这些重要反应，将在第五章与确定肽的氨基酸排列顺序有关一段中详细讨论。

## R 基团的反应

氨基酸由于在其 R 基上有某些官能基例如：半胱氨酸的 SH 基、酪氨酸的酚羟基和精氨酸的胍基等，也能显示出特有的定性呈色反应。虽然这些颜色反应常常被用来作斑点

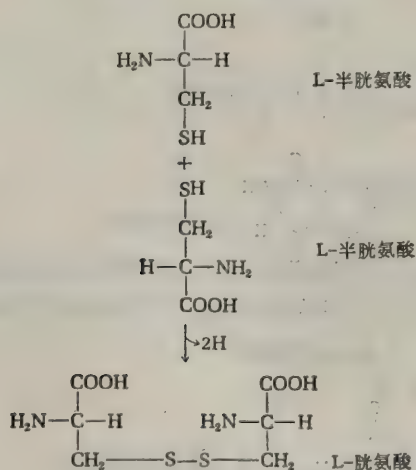


图 4-22 半胱氨酸氧化成胱氨酸

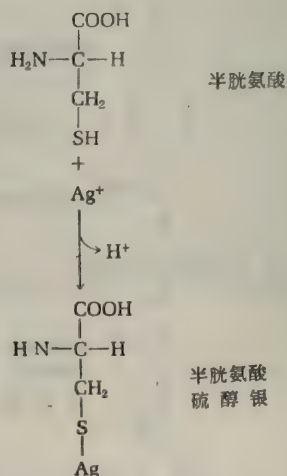


图 4-23 半胱氨酸同  $\text{Ag}^+$  的反应

试验或定性鉴定，但在非常低的浓度下，借助色层方法（参看下面），方能更精确地鉴定和测定各种氨基酸。然而，氨基酸侧链中，一些其它官能基团在蛋白质生物活性中有着重要的作用，半胱氨酸的巯基或硫氢基就是其中之一。这种非常活跃的基团对氧化作用具有



高度敏感性,在铁盐存在下极易被大气中的氧原子氧化成双硫基,或者被其它温和氧化剂所氧化。氧化产物是胱氨酸(图 4-22),在胱氨酸中双硫键在两个半胱氨酸的残基之间构成一种共价桥。半胱氨酸巯基另一重要而又具有特征性的反应是与重金属,如  $Hg^{2+}$  和  $Ag$ , 反应形成硫醇盐(图 4 23)。半胱氨酸的和蛋白质与肽类中半胱氨酸残基的巯基能

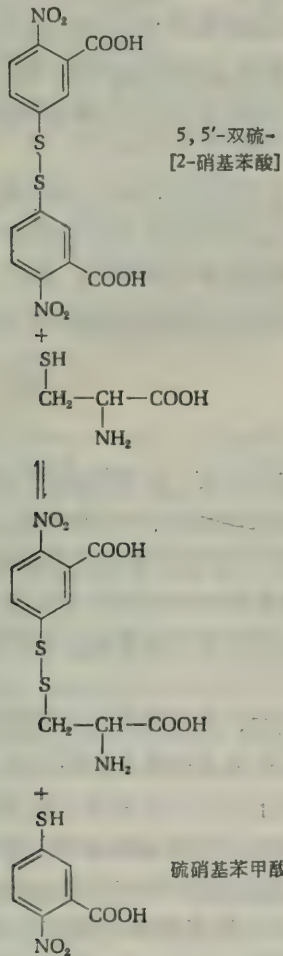


图 4-24 胱氨酸同 Ellman 氏试剂的反应。这种反应引起一分子硫硝基苯甲酸的释放,它在 pH 8.0 时,对 412 毫微米波段有强烈的吸收作用。

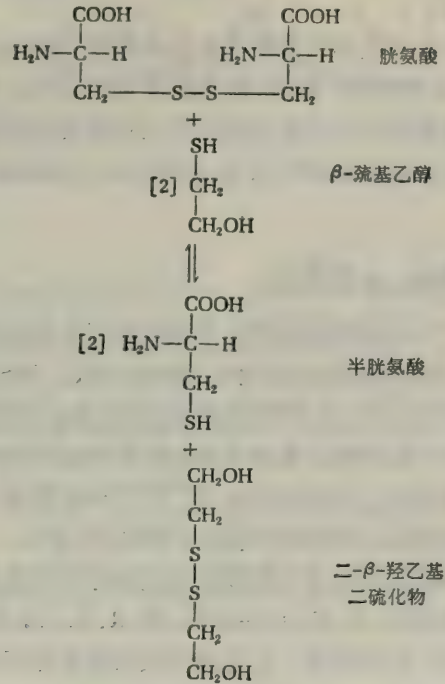


图 4-25 胱氨酸还原成半胱氨酸

用 Ellman 氏试剂(图 4-24)作定量反应测定之,它所生成的颜色产物,可以比色法测定之。我们在后面将看到,某些酶分子中特有的半胱氨酸残基上的巯基在酶的催化活性中起重要作用,用上述这些方法去改变这种巯基常常使酶失去活性。

胱氨酸是半胱氨酸的氧化形式,在蛋白质结构中起一种特殊作用,因为它的双硫基在两个多肽链之间或单链两点之间起一个共价交联作用。双硫键交联能被还原剂,例如巯基乙醇所作用而裂开,从胱氨酸中产生两个分子半胱氨酸(图 4-25)。胱氨酸亦能以过甲酸这种试剂氧化,产生两个分子磺基丙氨酸。这一重要反应将在后面讨论。巯基和双硫基等两者,在强碱性溶液中被破坏,形成许多产物。

## 氨基酸混合物的分析

如果使用经典分离方法,象分段沉淀法、结晶法或蒸馏法等,在水解蛋白质那样复杂的混合物中,去进行每一种氨基酸的定量分离和测定是一个艰巨问题。25年前只定量分析混合物中一种氨基酸可能就要工作几个月。直到层析法有条不紊地用于分析氨基酸混合物的时候,在研究蛋白质详细结构上才获得一些有意义的进展。自从那时以后,根据层析的这些原理而建立的分析方法已经改变许多,且能够很快、很准确和很灵敏;它们也已自动化了。

色层方法不仅能使用于氨基酸混合物的分离、鉴定和定量分析,而且也能用于肽类、蛋白质、核苷酸、核酸、脂类和醣类的分析。由于今日使用多种不同层析方法在生物化学里有着普遍的重要性,所以我们将简要地回顾一下它们的物理原则。显然,以层析和电泳方法分离氨基酸的技术,全然是以不同氨基酸的相对溶解度与酸-碱行为的知识为基础的。

### 分配原理: 分配层析

若让一种溶质在两种体积相等互不相混的液体中分布,则该溶质在一定温度达到平衡时,两相中的浓度之比称为分配系数。氨基酸能以这种方式在两种液相之间(如酚-水对或正丁醇-水对之间)进行分配;每种氨基酸对任何一定的互不相混的溶剂对,都有一个独特的分配系数。具有不同分配系数的物质的混合物都能采用称为逆流分溶的一种技术作定量分离。此法首先由 L. C. Craig 创建,进行中采取多次重复的分配步骤。逆流分溶的原理以一简单例子概括于图 4-26 中。

分配层析实质上是以上述逆流分配原理为基础的,混合物的一种层析分离。它是首先由英国的 A. T. P. Martin 和 R. L. M. Syngé 作为分离氨基酸的一种有力方法发展起来的。自此以后,便运用于较大数目的不同物质上。此种分离是在巨大数目的分离分配步骤中完成的,分离步骤是在非水溶性惰性物质(如淀粉或硅胶颗粒)的极微细颗粒上进行的。它们填充在约 10—100 厘米长的柱中。淀粉或硅胶颗粒是疏水性的,并且被紧密结合的水层包围,此水层作为一种固定含水相,而一种移动相则流经它,移动相是一种与水不相混的溶剂,它含有要分离的混合物。溶质混合物在一个固定水层和流动溶剂之间进行极微细的分配过程。此过程是在每一颗粒表面发生的,类似逆流分溶的分配步骤。在淀粉或硅胶柱中进行的单个颗粒溶质分配过程不一定完全达到平衡,但是在柱中分配步骤的总次数是如此之大,故当流动液相经过时,混合物中的氨基酸以不同的速率往柱下移动。出现在柱底部的液体称洗脱液,用自动分段收集器成小部分收集起来,并用茚三酮反应方法定量分析。以每管氨基酸的量对管数或分部数作图,将呈现一系列峰,每一个峰相当于不同的一种氨基酸量。

氨基酸纸上层析所涉及的原理基本上是一样的。滤纸纤维的纤维素是水合了的。当含有氨基酸混合物的溶剂借助于毛细管作用沿着保持垂直的滤纸上升时(在下行层析中为下降),在流动相和结合在纸纤维上的固定水相之间,氨基酸发生多次微小的分配。在这一过程的末尾,不同氨基酸从原起点移动了不同的距离。将层析纸烘干,用茚三酮溶液



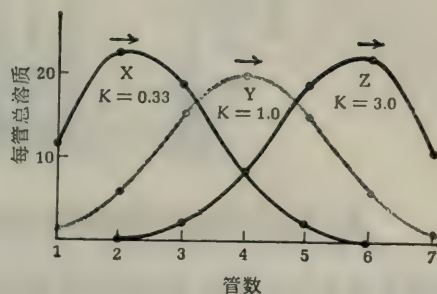
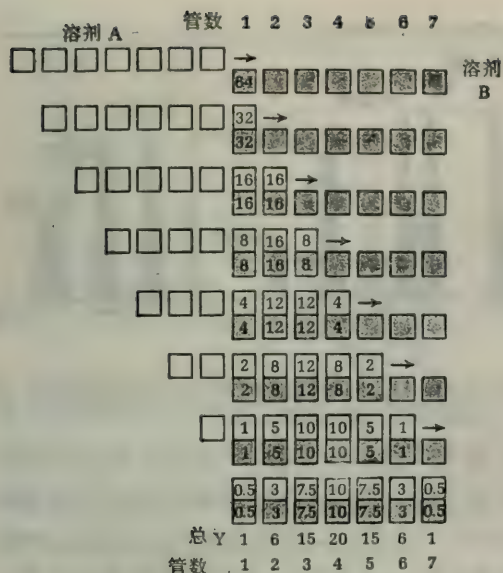


图 4-26 逆流分溶，逆流分溶包括在两种不相混溶剂之间的混合物的多次重复分配。这一原理可用一种单一物质 Y，它在溶剂 A 和 B 之间的分配系数 ( $K = [Y]_A/[Y]_B$ ) 等于 1.0 来说明。溶质 Y (64 个单位) 溶解于放在 1 管内的一定体积的溶剂 B 中；2 至 7 管含有等体积的纯溶剂 B。向第 1 管内加入一定体积的溶剂 A，并且摇匀平衡；结果，溶质 Y 在溶剂 A 和 B 之间等量分配，即在每一管中 32 个单位。从 1 管来的溶剂 A (上层) 重新转移到管 2，并且向 1 管加入新的溶剂 A。1 管和 2 管摇匀平衡，根据分配系数  $K = 1.0$ ，结果是两管中的每一溶剂层含有 Y 16 单位。在每一个分配步骤之后，每一管上层移去并加入右侧的下一管；每一次一层新鲜的溶剂 A 加到 1 管，图解表示七次分配步骤的结果，在现实的实验实践中，已采用 100 次以上的分配步骤。

7 个管的每一管 Y 溶质的总量都描绘出来。为了比较，取另外两种溶质 X 和 Z (64 个随意单位)，经过同一逆流分溶装置并列出其分布情况。溶质 X 的分配系数较低 ( $K_X = [X]_A/[X]_B = 0.33$ ) 而溶质 Z 的分配系数则较溶质 Y 的高 ( $K_Z = [Z]_A/[Z]_B = 3$ )。分配系数愈高，则每转移一次溶质移动的部分愈大，由于每一种溶质的移动是按照它自己的分配系数进行的，而与另一种溶质无关，故溶质 X、Y 和 Z 的混合物经过颇多次数的转移之后，将呈现三个峰而完全分离。

喷雾，并加热以确定氨基酸的位置。在双向纸层的重要改进中，氨基酸混合物沿一个方向层析，然后烘干纸，并用一种不同溶剂沿着与第一次成直角的方向再次进行层析。不同氨基酸的双向图于是形成。双向纸层或者沿一个方向纸电泳(看下面)后，再朝直角方向进行层析，已广泛地使用，以分离氨基酸和肽类。

## 离子交换层析法

在首先由 W. Cohn 发展的离子交换层析法中，分配原理得到进一步完善。在此法中溶质分子是通过它们酸碱行为的不同而挑选出来的。在这一方法中，用一种带有固定电荷基团的合成树脂填充层析柱。主要离子交换树脂有两种：即阳离子交换剂和阴离子交换剂。氨基酸一般是在阳离子交换层析柱上分离的。柱中填满了磺化聚苯乙烯树脂的固体颗粒，并事先用 NaOH 溶液平衡过，这样使树脂的磺酸基团全部带有  $\text{Na}^+$ 。这种形成的树脂称为“钠型”；以酸洗涤也可将树脂制备成质子化型或“氢型”。向洗涤的“ $\text{Na}^+$ 型”树脂中加入氨基酸混合物的酸性溶液 ( $\text{pH} = 3.0$ )；在  $\text{pH} 3.0$  时大部分氨基酸是带有净正电荷的阳离子。阳离子氨基酸能从树脂颗粒中置换一些结合的  $\text{Na}^+$  离子；因为不同氨基酸

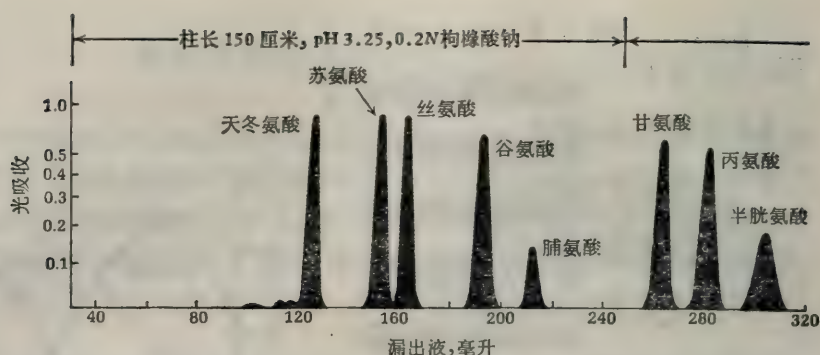


图 4-27 氨基酸离子交换树脂层析的自动记录图谱。使用 pH 值相继增高的不同缓冲液洗脱。以氨基酸的含量成比例。[引自 D. H. Spackman, W.

的电离程度有小差别,所以在它们中间对  $\text{Na}^+$  离子的置换数量也稍有不同。在 pH 3.0 时,绝大多数碱性氨基酸(赖氨酸、精氨酸和组氨酸)借助静电吸引力,与树脂的结合将最牢固;而绝大多数酸性氨基酸(谷氨酸、天冬氨酸)则结合最少。当含水的洗脱介质的 pH 和 NaCl 浓度逐渐增加时,各种氨基酸以不同速度从柱上向下移动,洗脱液则收集成许多小分部,这些小分部可以用茚三酮反应作定量分析。阴性最强的离子,例如谷氨酸,首先出现,而阳性最强的离子,例如赖氨酸,则最后出现,从这个数据中,可绘成洗脱曲线(图 4-27)。全部分析过程已能自动控制。在一个叫做氨基酸分析装置中,通过伺服机构,可自动完成洗脱、分部收集,每分部样品的分析和数据记录等操作。氨基酸分析技术是由纽约市洛克菲勒研究所的 W. Stein 和 S. Moore 创建的。

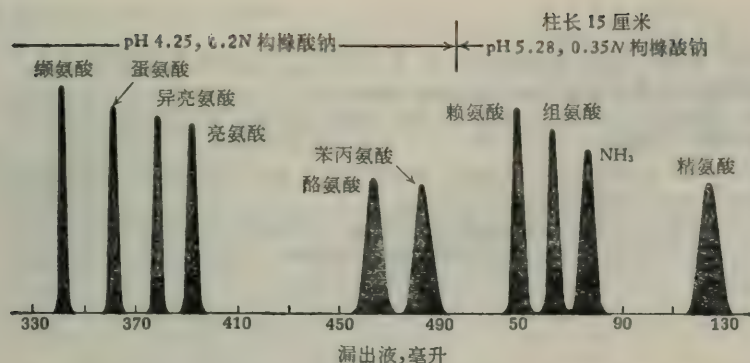
为了减少氨基酸成分精确层析测定所需时间,特别是在蛋白质水解液中,常采用极短的离子-交换柱,并加压使洗脱缓冲液迅速通过层析柱。这些和其它改进的方法,使得人们能在不到 2 小时内可以测定混合物中全部氨基酸的类别和量,而且只需不到一毫克标本。

分离氨基酸的另一方法是纸上电泳。将一滴氨基酸混合液点在滤纸上,然后用一定 pH 的缓冲液润湿滤纸条。纸条两端浸入电极槽中施加一定电场。由于它们的  $\text{pK}'$  值不同,各种氨基酸以不同的方向和不同速率移动,但这又决定于缓冲系统的 pH 和使用的电势(emf)例如 pH 1 时,组氨酸和赖氨酸所带电荷为 +2,而所有其它氨基酸的电荷均为 +1。在 pH 11,天冬氨酸、谷氨酸和酪氨酸所带电荷为 -2,所有其它氨基酸的电荷均为 -1。已知氨基酸的酸碱性质就有可能选择适当的条件,以分离任何已知氨基酸混合物。氨基酸也能以薄层层析法分离,它是一种改良的分配层析方法,这将在第十一章讨论。

## 摘 要

在蛋白质的水解产物中常见的 20 种氨基酸,都同样含有一个  $\alpha$ -羧基和一个  $\alpha$ -氨基,但  $\alpha$ -碳原子上取代的 R 基团的化学本质不同。因此可根据其 R 基团的极性性质进行氨基酸的分类。非极性(疏水性)类包括丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、色氨酸和蛋氨酸。极性中性 R 类包括甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、酪氨酸、天冬





小容积收集流出物, 每管中的氨基酸含量均系自动分析。每个谱峰下所包括的面积与混合物中每种  
H. Stein and Moore, *Anal. Chem.*, **30**: 1190 (1958)]

酰胺以及谷氨酰胺。带正电荷(碱性)的氨基酸类包括精氨酸、赖氨酸和组氨酸;带负电荷(酸性)的氨基酸类包括天冬氨酸和谷氨酸。在少数特殊的蛋白质中,可能发现其它氨基酸,如羟脯氨酸、羟赖氨酸和锁链素。

在低 pH 下单氨基单羧基的氨基酸是二元酸 ( $\text{H}_3\text{N}^+\text{CHRCOOH}$ )。若 pH 升高到 6 左右,就会从羧基上失去质子,生成偶极或兼性离子形式,  $\text{H}_3\text{N}^+\text{CHRCOO}^-$  型,它是电中性的。当 pH 继续增加时引起第二个质子的丢失,产生  $\text{NH}_2\text{CHRCOO}^-$  离子形式。第一次电离(即  $\alpha$ -羧基)的  $pK'$  值约为 2.0—2.5;第二次电离的  $pK'$  值约为 9—10。具有可电离的 R 基团的氨基酸,可能以另外的离子形式存在,这取决于其 R 基团的  $pK'$  值。氨基酸的  $\alpha$ -碳原子(甘氨酸除外)是不对称碳原子,因此至少可出现两种立体异构体;在蛋白质中只发现有与 L-甘油醛相关的 L-立体异构体。

所有  $\alpha$ -氨基酸都能与茚三酮生成一种分析上有用的颜色衍生物。 $\alpha$ -氨基酸亦易酰化,与氯甲酸苄酯产生氨基酸苄氧羰基衍生物。 $\alpha$ -氨基与醛类形成 Schiff 氏碱,并且与氰酸盐起反应,生成氨基甲酰衍生物。氨基酸的羧基和 R 基亦显示特征性反应。半胱氨酸的巯基易被氧化产生胱氨酸,它又能逆转还原成半胱氨酸,如此一些反应在分析和鉴定特殊氨基酸时非常有用。

氨基酸的复杂混合物可用纸层析或离子交换柱层析,以及纸电泳等去进行分离、鉴定和估量。这些方法利用了不同氨基酸的溶解度和(或)酸碱行为的差异。

## 参 考 文 献

### 书籍

See also references to Chapters 3, 5, 6, and 9.

Alworth, W. L.: *Stereochemistry and Its Application to Biochemistry* Wiley-Interscience, New York, 1972. A valuable book on a complex subject. The Cahn-Ingold-Prelog, or RS, system of designating the absolute configuration of stereoisomers is given in detail; the principles of the RS system are also described in textbooks of organic chemistry.

Blackburn, S.: *Amino Acid Determination*, Dekker, New York, 1968. Comprehensive treatise on analytical methods.

Edsall, J. T., and J. Wyman: *Biophysical Chemistry*, vol. 1, Academic, New York, 1958. Excellent treatment of amino acids as electrolytes.

Greenstein, J. P., and M. Winitz: *Chemistry of the Amino Acids*, 3 vols., Wiley, New York, 1961.

Meister, A.: *Biochemistry of the Amino Acids*, 2d ed., 2 vols., Academic, New York, 1965. Authoritative and comprehensive treatment of structure, occurrence, and metabolism of protein and nonpro-

tein amino acids.

## 论文

- Fowden, L.: "The Non-Protein Amino Acids of Plants," in L. Reinhold and Y. Liwischitz (eds.), *Progress in Phytochemistry*, vol. 2, Interscience, London, 1970.
- Fowden, L., D. Lewis, and H. Tristram: "Toxic Amino Acids: Their Actions as Antimetabolites," *Adv. Enzymol.*, 29: 89—163 (1968).
- Hirs, C. H. W. (ed.): "Amino Acid Analysis and Related Procedures," Sec. 1 in *Methods in Enzymology*, vol. II, Academic, New York, 1967.
- Spackman, D. H., W. H. Stein, and S. Moore: "Automatic Recording Apparatus for Use in the Chromatography of Amino Acids," *Anal. Chem.*, 30: 1190—1206 (1958). A description of the automatic amino acid analyzer.

## 习 题

1. 试命名蛋白质中存在的某一种氨基酸, 这种氨基酸用强碱处理时能转变成蛋白质中存在的另一种氨基酸。
2. 试命名一种天然存在的氨基酸, 它的等电点大于 8.0, 用氢硼化锂处理时预期生成分子量为 118 的衍生物。
3. 从它们的  $pK'$  值(表 4-2)中试计算甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸、苏氨酸和谷氨酸的  $pH_i$  值。
4. 参照表 4-2 所列的必需  $pK'$  值, 标明甘氨酸、天冬氨酸、赖氨酸和组氨酸在 (a)  $pH$  1.0; (b)  $pH$  2.1; (c)  $pH$  4.0; (d)  $pH$  10.0 时的净电荷(—, 0 或+)。
5. 在  $pH$  6.0 时, 对甘氨酸、丙氨酸、谷氨酸、赖氨酸、精氨酸和丝氨酸的混合物进行纸电泳。  
试问: (a) 哪些化合物向阳极移动速度最快?  
(b) 哪些化合物向阴极移动速度最快?  
(c) 哪些化合物仍留在原点或接近原点?
6. 将赖氨酸、精氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、酪氨酸和丙氨酸的混合物在高  $pH$  下放入阳离子交换树脂中, 在用连续降低  $pH$  的溶液去处理树脂时, 试预计它们洗脱的顺序。
7. 丝氨酸、丙氨酸和异亮氨酸的混合物在含有  $n$ -丁醇、水和醋酸溶剂系统中进行单向纸上层析。试预计在上述系统中氨基酸的相对移动率, 首先写出预料移动的距离原点最远的一种氨基酸。
8. 你应该加多少克  $NaOH$  到 500 毫升已经充分质子化了的 0.01 M 组氨酸溶液中, 才能配成  $pH$  7.0 的缓冲液?
9. 向 1.0 升 1.0 M 甘氨酸等电点  $pH$  的溶液中加入 0.3 克分子  $HCl$ 。  
(a) 所得溶液的  $pH$  将是多少?  
(b) 若加入的不是  $HCl$  而是 0.3 克分子的  $NaOH$ , 则其  $pH$  又是多少?
10. 已将 400 毫升 L-丙氨酸溶液调节至  $pH$  8.0, 然后用过量的甲醛处理。所得溶液需要加入 0.2 M  $NaOH$  溶液共 250 毫升, 才能反滴定到  $pH$  8.0。试问原溶液中含有多少克 L-丙氨酸?
11. 试利用表 4-3 的数据计算, 在 25°C 的水溶液中, 用光源为钠光 D 线的 25 厘米管长的旋光计管的 1.10 M 丙氨酸的旋光度。
12. 仅含有 L-异亮氨酸和 L-苯丙氨酸的溶液, 在 25 厘米长的旋光计管中, 25°C 下, 观察所得旋光度为  $-1.97^\circ$ 。当取部分溶液 100 毫升, 调节酸碱度至  $pH$  8.0, 并且用过量的甲醛处理后, 需要用 0.5 N  $NaOH$  66.8 毫升方能滴回到  $pH$  8.0。问: 在原标本溶液中 (a) 异亮氨酸和 (b) 苯丙氨酸克分子浓度各为多少?
13. 甘氨酸在 A 溶剂中的溶解度是它在 B 溶剂中的四倍, 而苯丙氨酸在 A 溶剂中的溶解度则只有它在 B 溶剂中的一半。溶剂 A 和 B 是不相混的; 溶剂 B 比溶剂 A 较重。含有甘氨酸 1.0 毫克和苯丙氨酸 1.0 毫克的混合物, 用等体积 A 与 B 溶剂在分液漏斗中进行振摇, 直至达到平衡为止。然后将上层溶液转移到另一分液漏斗中, 又加入等体积的新鲜溶剂 B。摇振内容物到平衡。计算第二次平衡后在 A



溶剂中的甘氨酸和苯丙氨酸量。

14. 氨基酸 X 在 A 溶剂中的溶解度是在 B 溶剂中的四倍, 氨基酸 Y 在 A 溶剂中的溶解度只有它在 B 溶剂中的  $1\frac{1}{2}$  倍。用溶剂 A 和 B 之间的逆流分溶去分离 X 和 Y。从 100 毫克 X 和 100 毫克 Y 开始, 问: (a) 在四管逆流分溶系统中(参看图 4-26), 哪一管含 X 最多, 哪一管含 Y 最多? (b) 在每一管中每种氨基酸各有多少毫克?

15. 假若题 14 的逆流分溶扩大到总数 20 管, 问: (a) X 和 (b) Y 在第 20 管中各有多少毫克?

16. 向处于等电点的 400 毫升 0.1 M 甘氨酸中加入 0.5 M 醋酸。试计算 (a) 混合物中的 pH, 以及 (b) 甘氨酸占优势的等电形式在混合物中的近似浓度。

17. 0.1 M 的谷氨酸溶液处于它的等电点。

(a) 计算主要等电形式的近似浓度。

(b) 计算完全质子化形式的近似浓度。

(c) 在溶液中甚至浓度小到几乎没有的, 共有多少种形式?

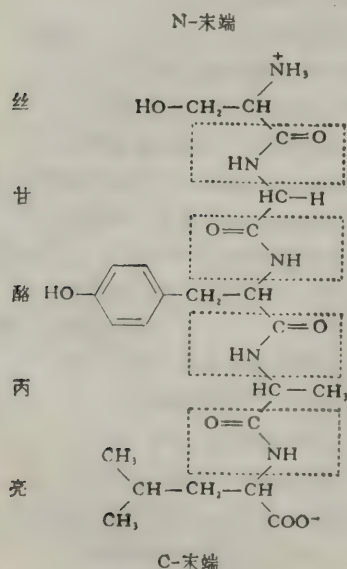
[颜学军译 任邦哲校]

## 第五章 蛋白质：共价主链与氨基酸顺序

本章讨论蛋白质一级结构的各个方面。我们已经指出过一级结构是指多肽链的共价骨架,包括氨基酸的顺序。本章将首先介绍简单肽类的特性,然后讨论蛋白质化学中的三个主要问题:(1)多肽链中氨基酸顺序的测定;(2)不同种属中不同蛋白质的氨基酸顺序变异的意义;(3)多肽链的实验室合成。我们将使用第三章已用过的各种名词和概念,为熟悉本章可以查阅。

### 肽类的结构

含有由两个、三个、四个或更多的氨基酸残基的简单肽类(即二肽、三肽、四肽等)是通过肽键共价连接的,它们可由部分水解蛋白质中很长的肽链形成。从这类水解物中已分离或用化学方法合成已得到几百种不同的肽类。蛋白质在消化道中被水解肽键的酶——蛋白酶消化也生成肽。肽的命名可根据其组成氨基酸,从氨基末端(简称 N-末端)起依次称呼。(图 5-1)



丝氨酰甘氨酰酪氨酰丙氨酰亮氨酸

图 5-1 一种五肽的结构。从 N-末端残基开始命名。肽键是用方框标出。

很多证据证明肽键是蛋白质长链主链结构上氨基酸之间的唯一共价连接。这种证据不仅来自于化学及酶促降解法研究,也来自于各种物理学测定的结果。例如,蛋白质在远紫外区(180—220 nm)及红外区都有与真正肽类所表现的相类似的光吸收带。此外,X 光衍射分析(第六章)直接证明天然蛋白质中有肽键存在。此外,在氨基酸之间仅仅还有另一类型的共价键即半胱氨酸形成的双硫键。在某些蛋白质分子通过它将两条多肽链交联起来(链间双硫键)或将单一肽链的弯曲部分交联起来(链内双硫键)。

肽类可以看作是取代了的酰胺类。与酰胺基一样,肽键显示高度的共振稳定性。肽键中 C—N 单键约有 40% 的双键特性,而 C=O 双键约有 40% 的单键特性。这一事实导致两个重要结果:(1)肽键的亚胺(—NH—)基在 pH 0—14 范围内没有明显的离解或质子化倾向;(2)肽键的 C—N 键是比较刚韧而不能自由转动的,这一性质对于多肽链的空间构型有着非常重要的意义,我们将在第六章中谈到。

除了从蛋白质部份水解产物中所获得的大量各种短肽以外,在生物体内还发现有许

### 非蛋白质来源的肽类

除了从蛋白质部份水解产物中所获得的大量各种短肽以外,在生物体内还发现有许



多不是从蛋白质衍生而来的肽类(图 5-2)。这类非蛋白质肽类在结构上常常与那些从蛋白质水解遇到的肽类不一样。例如,在高等动物所有的细胞内发现的三肽谷胱甘肽,它所含的谷氨酸残基是通过一种不常见的肽键连接的,即通过它的  $\gamma$ -羧基而不是  $\alpha$ -羧基形成

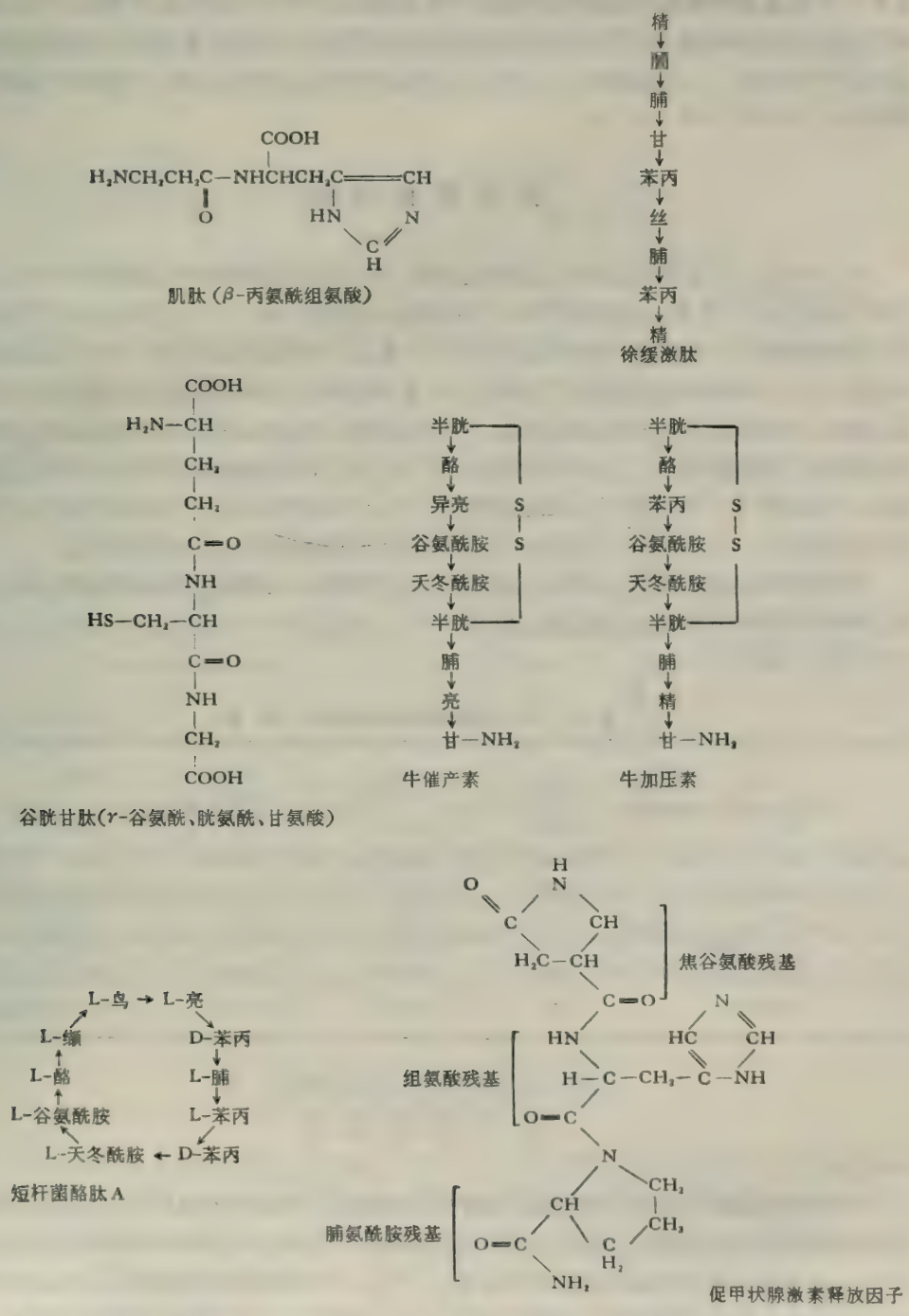


图 5-2 几种非蛋白质来源的生物多肽。这些肽常含有与蛋白质中不同的氨基酸。箭头表示极性或肽键方向;是从链的 N-末端指向 C-末端。

肽键。肌肉二肽肌肽含有一个  $\beta$ -氨基酸。某些非蛋白肽如抗菌素短杆菌酪肽 A 则含有 D-氨基酸。(图 5-2)。蛋白质内不存在有  $\beta$ -氨基酸,  $\gamma$ -肽键及 D-氨基酸。可能这些结构上的变异保护了这些特殊的肽类不被蛋白酶所水解, 蛋白酶通常是对在正常肽键中具有 L- $\alpha$  氨基酸的肽类有特异性。还有一些非蛋白质肽类具激素活性, 例如: 下丘脑调节因子(促进垂体前叶释放促甲状腺激素); 垂体后叶激素——催产素与加压素; 血浆中参与血压调节的九肽——徐缓激肽。许多抗生素都是肽类或肽的衍生物; 包括短杆菌素和缬氨霉素(一种环状十肽)。

## 肽的酸碱性质

肽类的熔点常常很高, 说明它们和氨基酸一样, 从中性溶液中是以偶极离子形式结晶为离子晶格。由于凡是以肽键连接的  $\alpha$ -羧基和  $\alpha$ -氨基在 pH 0~14 范围内均不可能离解, 所以肽的酸碱行为是由 N-末端残基的游离  $\alpha$ -氨基、羧基末端(简称 C-末端)残基的游离  $\alpha$ -羧基, 以及在肽链中间部位的可离解的 R-基形成的。在长的肽链上可离解的 R 基必然远远超出末端残基的可离解基的数目。由于在肽链上的游离氨基与游离羧基被主链原子所分隔而比在氨基酸分子上的距离要远。所以它们之间的静电及诱导作用降低, 因此其末端  $\alpha$ -羧基的  $pK'$  值比游离  $\alpha$ -氨基酸要高一些, 而  $\alpha$ -氨基的  $pK'$  值又比游离  $\alpha$ -氨基酸的低一些(表 5-1)。短肽中 R 基的  $pK'$  值与相应的游离氨基酸的  $pK'$  值接近。

短肽的酸碱滴定曲线与游离  $\alpha$ -氨基酸的非常类似。肽类滴定曲线不同阶段的主要离子种类可以与游离氨基酸的相比较(图 5-3)。肽类也有一个等电 pH, 它可以从  $pK'$  值计算出来。(表 5-1)

表 5-1 25°C 时某些氨基酸及肽类的  $pK'$  值

	$pK'_1$ $\alpha$ -COOH	$pK'_2$ $\alpha$ -NH $_3^+$	$pK'_R$ R 基团	pH $_i$
甘	2.34	9.6	—	5.97
甘-甘	3.06	8.13	—	5.59
甘-甘-甘	3.26	7.91	—	5.58
丙	2.34	9.69	—	6.02
丙-丙-丙-丙	3.42	7.94	—	5.68
丙-丙-赖-丙	3.58	8.01	10.58	-9.3
甘-天冬	2.81	8.60	4.45	-3.6

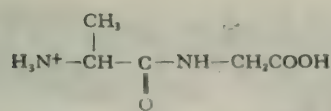
## 肽的光学性质

如果在相当温和条件下进行蛋白质的部份水解, 不对称  $\alpha$ -碳原子不会发生消旋作用, 则所生成的肽具有旋光活性, 因其只含 L-氨基酸。在比较短的肽, 观测到的总旋光活性约为其组成氨基酸残基的旋光活性之和。然而, 天然构型的蛋白质长肽链其光学活性比其组成氨基酸的光学活性之和要小得多, 这一事实对于蛋白质的二级和三级结构有着很大的意义, 我们将在第六章中予以讨论。

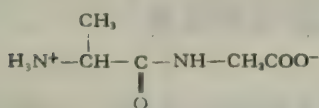


## 肽的化学性质

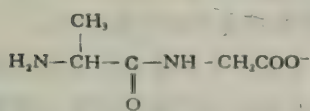
肽的 N-末端游离氨基与游离氨基酸的  $\alpha$ -氨基进行的化学反应相同, 如酰化及氨基甲酰化。肽的 N-末端氨基酸残基也能定量地与茚三酮起反应而生成颜色产物; 在电泳和



在 pH = 1.0 阳离子型



在 pH = 6.0 等电型



在 pH = 11.0 阴离子型

图 5-3 二肽丙氨酸甘氨酸的主要离子类型

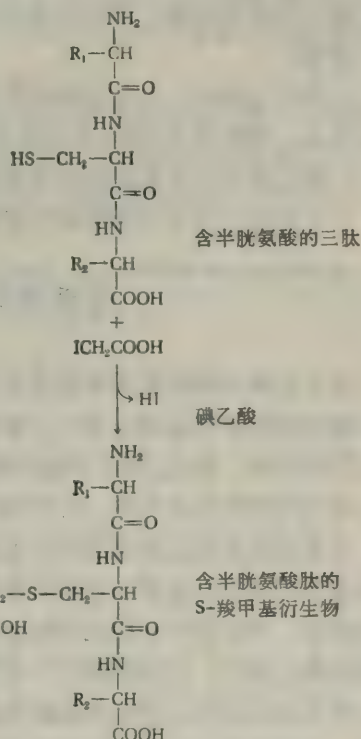


图 5-4 含一个半胱氨酸残基的肽的 S-烷化

层析法中广泛应用茚三酮反应作肽的检测与定量。同样, 肽的 C-末端羧基可酯化或还原。而且, 肽链中不同氨基酸残基上的各种 R 基通常也产生和游离氨基酸同样特征性的反应。

双缩脲反应是在肽类及蛋白质中广泛应用的颜色反应, 而游离氨基酸却没有此反应。用硫酸铜及碱处理肽或蛋白质可生成一种紫红色的  $\text{Cu}^{2+}$  肽络合物, 它可用分光光度计进行定量测定。

## 测定氨基酸顺序的步骤

以上述简单肽类性质的知识为基础, 我们可以讨论用来测定肽和蛋白质的氨基酸顺序的通用方法, 这是 S. Sanger 1953 年开拓性地测定胰岛素多肽链的氨基酸顺序时设计的。胰岛素因而成为第一个弄清楚了全部共价结构的蛋白质。虽然每一个蛋白质都具有其特殊性, 但下述步骤可以通用:

1. 若该蛋白质含有肽链一条以上, 首先要将各条肽链分离并纯化之。
2. 将所有双硫键还原, 并将所生成的巯基烷基化。

3. 将每条多肽链的一份样品进行完全水解,并测定其氨基酸组成。
  4. 对多肽链的另一份样品作 N-末端及 C-末端鉴定。
  5. 将完整的多肽链用酶解或化学水解法断裂成为一系列较小的多肽。
  6. 将第五步所得的肽片段进行分离,并测定其氨基酸组成和顺序。
  7. 将原来多肽链的另一份样品用第二种方法进行部份水解,此法断裂肽链部位应不同于第一次部份水解。再将所得的肽碎片分离和测定其氨基酸组成及顺序。(如第 5 及第 6 步骤)
  8. 将两套肽碎片的氨基酸顺序进行比较,特别是注意第一套肽碎片与第二套肽碎片的断裂点上相重叠的部位,即可将肽碎片按恰当的次序排列以得出完整的氨基酸顺序。
  9. 测定原来的多肽链的双硫键和酰胺基的位置。
- 以下将对上述全过程中每个步骤的操作方法进行讨论。

## 双硫键的断裂及多肽链的分离

在分析蛋白质的氨基酸顺序之前,必须先确定该蛋白质是否含有一条以上的肽链。多肽链的数目通常从测定每分子蛋白质所含 N 末端氨基酸残基的数目推导出来。其方法将在后面介绍。显然,每分子蛋白质所含 N-末端氨基酸的数目应与其肽链数目相等。如果肽链之间没有共价交联,可以用酸、碱、高浓度的盐或变性剂分离它们。

若多肽链是通过胱氨酸半个残基之间形成一个或多个双硫键而有共价交联,那就必须由适当的化学反应断裂这些交联键。最常用的方法是用过量的巯基乙醇将双硫键还原成为巯基。然后用一种烷基化剂如碘乙酸使巯基还原成为 S-羧甲基衍生物(图 5-4)。随后将多肽链水解时,这些残基以 S-羧甲基半胱氨酸的形式出现,它很容易用氨基酸分析的层析技术鉴定出来。将半胱氨酸残基进行烷基化是必要的,因为相对而言其巯基是不稳定的,并易被氧化。其他的试剂如碘乙酰胺及乙撑亚胺也用于巯基的烷基化。一个最初由 Sanger 建立的古老而不常用的断裂双硫键方法是先将双硫键氧化使半胱氨酸变成磺基丙氨酸(图 5-5)。一旦链间双硫键断裂,通常采用电泳法分离各个多肽链。

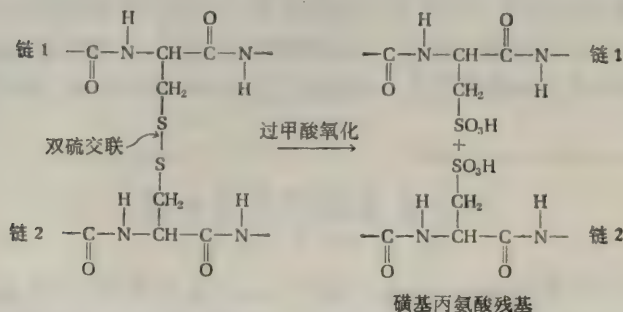


图 5-5 用过甲酸氧化断裂双硫键

## 多肽链的完全水解及氨基酸组成的测定

一旦制得纯一的不含双硫键或游离巯基的待测多肽链后,便将它完全水解并测定其



氨基酸组成。与酸或碱共热时多肽链很容易被水解。常用的全水解方法是将多肽与过量的 6 N 盐酸置于真空和封口管内在 100—120℃ 加热 10—24 小时。在此条件下氨基酸很少或没有消旋。但不是所有氨基酸在酸水解下都能定量回收;这种处理常使色氨酸破坏,丝氨酸和苏氨酸也有某些损失。此外,天冬酰胺与谷酰胺在酸中将完全水解生成游离的天冬氨酸和谷氨酸,加上游离的铵离子。

多肽链与浓氢氧化钠溶液一起煮沸也可被水解,但碱水解破坏半胱氨酸、胱氨酸、丝氨酸及苏氨酸,并使所有氨基酸消旋。碱水解通常仅用于分开测定色氨酸。色氨酸对酸不稳定但对碱稳定。

多肽及蛋白质水解产物的氨基酸组成可在氨基酸分析仪中通过自动化离子交换层析测定。用这样的方法测出的第一个纯蛋白质氨基酸全组成就是乳汁内的  $\beta$ -乳球蛋白。这种分析用老方法需要工作几年,它是在 1947 年才完成的。现在用氨基酸分析仪在 2—4

表 5-2 用每分子中残基数表示的某些有代表性的蛋白质的氨基酸组成。蛋白质的编号字母是任意取的

	蛋白质编号字母(解释见下面)										
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
非极性											
丙	12	15	9	9	22	14	6	45	19	28	12
缬	6	9	11	7	23	14	3	9	17	39	9
亮	8	21	17	8	19	12	6	2	20	25	2
异亮	6	10	11	4	10	9	6	1	10	24	3
脯	2	8	17	4	9	8	4	7	17	20	4
甲硫	2	4	5	0	2	0	2	0	2	9	4
苯丙	3	4	8	2	6	8	4	4	11	18	3
色	6	2	2	1	8	3	1	1	6	2	0
极性(未带电荷的)											
甘	12	3	9	6	23	6	12	74	16	38	3
丝	10	7	16	7	28	16	0	17	30	26	15
苏	7	8	5	8	23	16	10	2	14	24	10
半胱	8	5	0	5	10	1	2	2	1	14	8
酪	3	4	10	4	4	4	4	23	8	4	6
天冬酰胺	13	5	8	2	14	10	5	1	17	8	10
谷氨酰胺	3	9	14	4	10	9	3	0	9	8	7
带负电荷的											
天冬	8	11	7	11	9	8	3	4	14	17	5
谷	2	16	25	9	5	7	9	4	13	21	5
带正电荷的											
赖	6	14	14	4	14	2	19	5	18	30	10
精	11	3	6	1	4	11	2	3	7	12	4
组	1	2	5	1	2	0	3	2	11	7	4
非极性百分数	35	46	40	36	40	43	31	33	39	44	30
总残基数	129	160	199	97	245	158	104	206	260	374	124

A = 小鸡溶菌酶	B = 牛 $\beta$ -乳球蛋白	C = 牛 $\alpha$ -酪蛋白
D = 菠菜铁氧还蛋白	E = 牛糜蛋白酶原	F = 烟草斑纹病毒外鞘蛋白
G = 马细胞色素 c	H = 家蚕的丝心蛋白	I = 人碳酸酐酶
J = 马醇脱氢酶	K = 牛核糖核酸酶	

小时内就可完成一种蛋白质水解产物的全部氨基酸组成的测定，而且只需要很少的样品。

这时了解一些有代表性的纯蛋白质的氨基酸组成是有益处的。(表 5-2)

从这些和其他可获得的数据可总结出某些规律：

1. 通常在蛋白质中发现的 20 种氨基酸并不是在所有蛋白质中都全部含有，例如：核糖核酸酶缺乏色氨酸；纤维状蛋白质如丝心蛋白及胶原蛋白缺乏几种氨基酸。

2. 某些氨基酸在蛋白质中的出现次数比其他氨基酸明显地少。例如，大部份蛋白质中组氨酸、色氨酸、蛋氨酸残基数的含量相对较少。如表 5-2 及表 5-3 所示。

3. 在多数蛋白质中，有 30—40% 的氨基酸残基为具非极性 R-基的氨基酸。膜蛋白质中的含量显得要高一些。在不溶性纤维蛋白-弹性蛋白中 90% 以上的氨基酸残基是非极性的。

4. 某些蛋白质如溶菌酶、细胞色素 c 及组蛋白以带正电荷的 R 基为主(在 pH 7.0 时)；这些蛋白质是碱性的。另外一些蛋白质中带负电荷的谷氨酸或天冬氨酸的 R 基占优势，如胃蛋白酶。这种蛋白质是高度酸性的。

表 5-3 大肠杆菌蛋白中氨基酸出现的相对频率 (以丙氨酸为 100)

氨 基 酸	相 对 频 率
丙	100
GIx	83
AsX	76
亮	60
甘	60
赖	54
丝	46
缬	46
精	41
苏	35
脯	35
异亮	34
甲硫	29
苯丙	25
酪	17
半胱	14
色	8
组	5

肽的 N-末端残基的鉴定

鉴定末端氨基酸的方法在确定氨基酸顺序的步骤中是非常重要的。鉴定 N-末端氨基酸残基第一个有用方法是由 Sanger 报道的。他发现肽的游离而未质子化的  $\alpha$ -氨基与 2,4-二硝基氟苯 (DNFB) 反应形成黄色的 2,4-二硝基苯的衍生物(图 5-6)。无论肽链长度如何,肽的这种衍生物一经用 6 N HCl 水解处理所有的肽键均将断裂、唯有 2,4-二硝基苯与 N-末端氨基酸的  $\alpha$ -氨基之间的化合键对酸水解相对地稳定。结果水解产物中除



N-末端氨基酸以黄色的2,4-二硝基苯衍生物存在以外,肽链上所有的其他氨基酸均成为游离氨基酸存在。这种标记了的氨基酸易与未取代的氨基酸分离,并可用各种已知氨基酸的2-硝基苯衍生物进行层析比较而鉴别之。

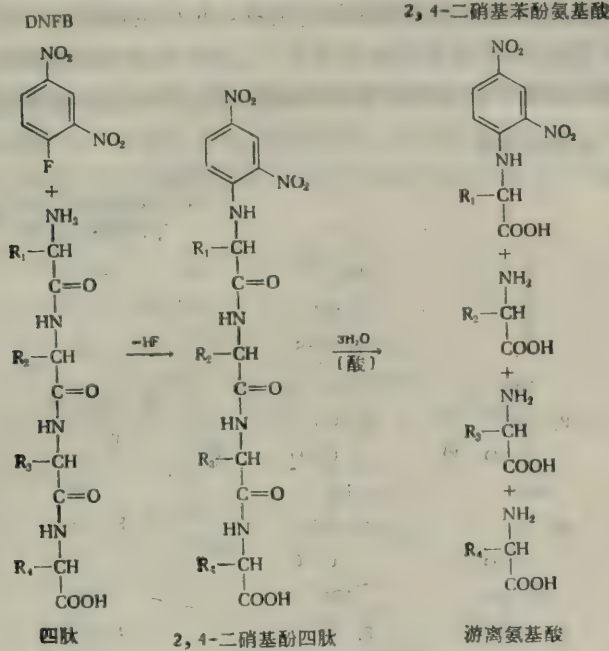


图 5-6 用 Sanger 反应鉴定一种四肽的 N-末端氨基酸残基

Sanger 的方法在很大程度上已被更灵敏和高效的方法所取代。可用标记试剂 1-二甲氨基萘磺酰氯,如图 5-7 所示。因为 dansyl 基(丹磺酰基)呈强荧光, N-末端氨基酸的丹磺酰衍生物只要极微量就可用荧光比色法测出。丹磺酰法比 Sanger 法要灵敏 100 倍。



图 5-7 以丹磺酰衍生物鉴定一种三肽的 N-末端氨基酸

最重要而最广泛应用的 N-末端残基标记反应是 P. Edman 设计的方法(图 5-8)。Edman 法中异硫氰酸苯酯与肽的游离氨基定量地反应生成相应的苯硫氨甲酰肽。用酸酐处理, N-末端残基以苯硫氨甲酰氨基酸形式裂解出来, 肽链其余部份保留完整。再将苯硫氨甲酰氨基酸环化成为相应的苯基海硫因衍生物。此衍生物通常可用气-液色谱法分离鉴定。另外也可在切除 N-末端氨基酸的前及后, 测定肽链的氨基酸组成, 由此可简单地推断以苯硫氨甲酰衍生物形式切除的 N-末端氨基酸, 这种技术叫做 Edman 减除法。

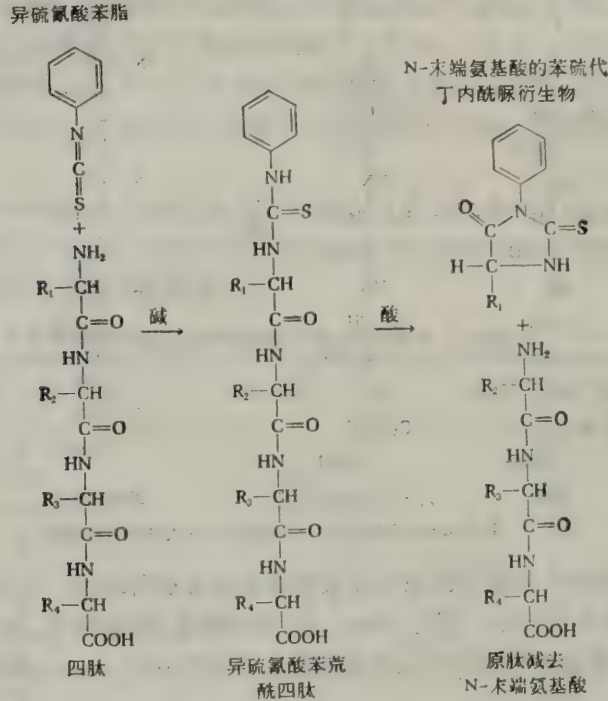


图 5-8 用 Edman 降解法鉴定 N-末端残基。注意切除 N-末端氨基酸后, 肽链保持完整。

Edman 法最大的优点是切除 N-末端氨基酸后留下的肽链的其余部份仍是完整的, 又可以反复进行同样的操作处理, 因此 Edman 法可从 N-末端开始按顺序鉴定几个甚至许多个相连的氨基酸。Edman 及 G. Begg 又进一步发扬了这种巨大的优越性, 他们已经制成了一种氨基酸顺序分析仪, 利用异硫氰酸苯酯将肽链按顺序降解, 氨基酸顺序自动分析仪现已广泛应用, 可以很迅速地测定多达 20 个残基的肽的氨基酸顺序。

在某些天然蛋白质中, N-末端残基被紧密折叠的分子深深地包埋, 使不易与标记试剂接近。在另一些蛋白质中, 如烟草斑纹病毒的外鞘蛋白, N-末端氨基酸的  $\alpha$ -氨基已是乙酰化了, 因而不能与标记试剂起反应。某些天然肽类因为是环状的, 它们没有游离 N-末端  $\alpha$ -氨基。例如, 抗菌的短杆菌酪肽 A 有 10 个氨基酸残基呈环状排列(图 5-2)。但没有证据说明蛋白质分子内也有环状肽链。

### 肽的 C-末端残基的鉴定

肽的 C-末端氨基酸可以用氢硼化锂还原成相应的  $\alpha$ -氨基醇。然后若将此肽链完



全水解,则水解产物中将含有一个相当于原来的 C-末端氨基酸的  $\alpha$ -氨基醇的分子。用色谱法很容易将它鉴定出来;而所有其它的氨基酸则均以游离状态存在。

另一个重要的方法是肼解法(图 5-9),它能将全部肽键断裂。除 C-末端氨基酸外所有氨基酸残基都转变成为氨酰肼。C-末端残基则以游离氨基酸形式出现,并能用色谱法迅速进行鉴定。

也可用羧肽酶选择性地将肽的 C-末端氨基酸水解下来,因为此酶特异性地作用于 C-末端肽键。缺点是此酶在水解切除 C-末端残基后,将继续水解新的 C-末端肽键。因此必须测量它从肽键上释放不同氨基酸的速率,以便确切地鉴定出 C-末端残基。

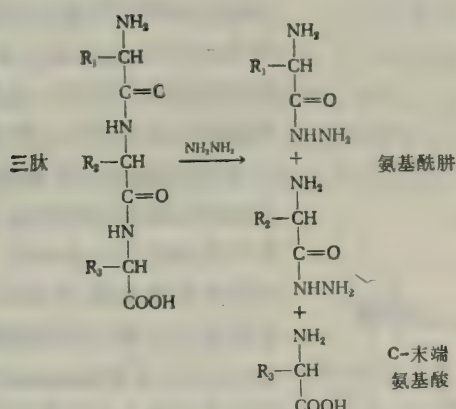


图 5-9 用肼 ( $\text{NH}_2\text{NH}_2$ ) 解法鉴定肽的 C-末端氨基酸 (Akabori 方法)

## 多肽链的部分水解

一旦将一个多肽链的 N-末端及 C-末端氨基酸残基鉴定出来后,在测定氨基酸顺序的总方案中的第二步就是将肽链断裂使生成一系列的短肽,以便能被分离和鉴定。这可通过将多肽链进行部分水解或选择性水解来实现。有时可以用稀酸进行部分水解,因而某些氨基酸对的肽键对酸水解比另一些氨基酸对的肽键敏感,但部分水解的首选方法还

表 5-4 多肽链的特异性断链

	$  \begin{array}{ccccccc}  \text{H} & \text{H} & & \text{H} & \text{R}_2 \\    &   & &   &   \\  -\text{N}- & \text{C}- & \text{C}- & \text{N}- & \text{C}- & \text{C}- \\  &   &    & &   &    \\  & \text{R}_1 & \text{O} & & \text{H} & \text{O}  \end{array}  $	
	氨基酸 1	氨基酸 2
方法	被断裂的肽键	
胰蛋白酶	氨基酸 1 = 赖或精	
糜蛋白酶	氨基酸 1 = 苯丙、色或酪	
胃蛋白酶	氨基酸 1 = 苯丙、色、酪及几种其他的	
嗜热菌蛋白酶	氨基酸 2 = 亮、异亮或缬	
溴化氰	氨基酸 1 = 甲硫	

是用能水解肽键的蛋白水解酶。现已有几种高度纯化了的蛋白水解酶，用于此目的（表 5-4）。最具特异性的是胰蛋白酶，此酶是一种消化酶，以无活性的前身胰蛋白酶原的形式

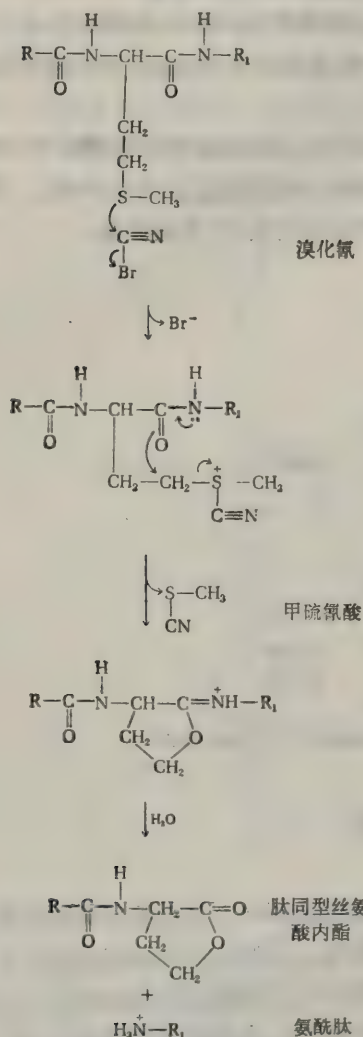


图 5-10 用溴化氰法所致的多肽键中甲硫氨酸处的断裂、甲硫氨酸残基转变成  $\alpha$ -碳末端同型丝氨酸内酯残基。

由胰脏分泌到小肠。胰蛋白酶很容易制备为纯结晶。不论肽链的氨基酸顺序及其长度如何，它仅能水解肽链上由赖氨酸或精氨酸残基提供羰基的肽键。因此由胰蛋白酶作用生成的肽碎片（以及游离氨基酸）的数目可断定肽链上赖氨酸和精氨酸残基的总数。

可用于多肽链部分水解的其它酶有糜蛋白酶、胃蛋白酶和嗜热菌蛋白酶。它们的肽键特异性如表 5-4 所示。虽然它们的特异性不及胰蛋白酶高，但仍可能非常有用，这取决于待研究的多肽链的氨基酸组成的情况。嗜热菌蛋白酶是一种耐热的细菌蛋白酶，它能水解由非极性氨基酸亮氨酸、异亮氨酸及缬氨酸提供氨基所组成的肽键。对于那些不含精氨酸和赖氨酸，因而不受胰蛋白酶作用的那些肽键来说，用此酶进行部分水解特别适用。嗜热菌蛋白酶在确定鱼精蛋白的氨基酸顺序时也是有用的，鱼精蛋白类是细胞核内的碱性蛋白质。它们含有那么多的精氨酸和赖氨酸残基，以致用胰蛋白酶断裂仍不能得出关于氨基酸顺序的有用资料。

特异的化学方法也已经发展起来了，它用于在特定的氨基酸残基处将多肽链断裂。最成功的是溴化氰多肽链的反应，它使甲硫氨酸提供羰基的肽键断裂。甲硫氨酸则转变成 C-末端同型丝氨酸内酯残基（图 5-10）。一个多肽链被溴化氰所断裂生成的片段数目可以从链上甲硫氨酸的数目得知。

氨基酸顺序分析方案中的部分至少采用两种不同的方法来断裂多肽链，使得一种方法所形成的小肽片段与另一种方法所形成的片段相重叠（见下面）。例如，如果用胰蛋白酶作第一次断链，则第二次可用某种其它酶，例如，糜蛋白酶、胃蛋白酶或嗜热菌蛋白酶也可用溴化氰反应。有时为了得到所需的重叠肽片还需要进行第三次或第四次部分水解。

## 肽的分离和分析

分离从蛋白质部分水解生成的复杂肽混合物要比分离氨基酸混合物困难得多，因为可能生成的肽种类比蛋白质中氨基酸种类多很多。一般有两种可能的手段，即纸上技术，



如纸层析及纸电泳,以及(效率更高且应用更广的)柱层析。两种方法都是利用肽在酸碱行为上的差异。

当应用纸上技术时,双向的方法是效果最好的。首先将肽混合物在纸上朝一个方向进行电泳,接着朝与第一方向成直角的方向再进行层析(或用另外一种 pH 进行电泳)。这种两步法产生一种双向肽谱。在晾干的纸上喷以茚三酮,然后加热,可以使肽显色定位。从另一张在同样条件下处理但没有染色的纸上将含肽的斑点剪下并洗脱,可以回收各个肽。如果有两个或多个肽形成重叠的斑点,可将它们洗脱,并用另一种溶剂系统再次层析。肽谱,又称肽指纹图谱,在鉴定不同种属的同类蛋白质时特别有用,而且在判断变异蛋白质中氨基酸取代位置时也非常有用。

肽混合物的柱层析通常是用离子交换柱进行。如同氨基酸分析一样,用 pH 或盐浓度梯度法进行洗脱。此法最大的优点在于可以自动化,并可以用氨基酸分析仪进行。另外一种分离肽混合物非常有效的方法是排阻层析或凝胶过滤法,这是在一种称为多聚糖衍生物(葡聚糖 Sephadex)的柱内进行的。这种层析分离是根据它们的分子量而不是酸碱性质。第七章将详细介绍凝胶排阻层析的物理原理。将自动化的离子交换层析及凝胶排阻层析联用在分离复杂的肽混合物时特别有效。

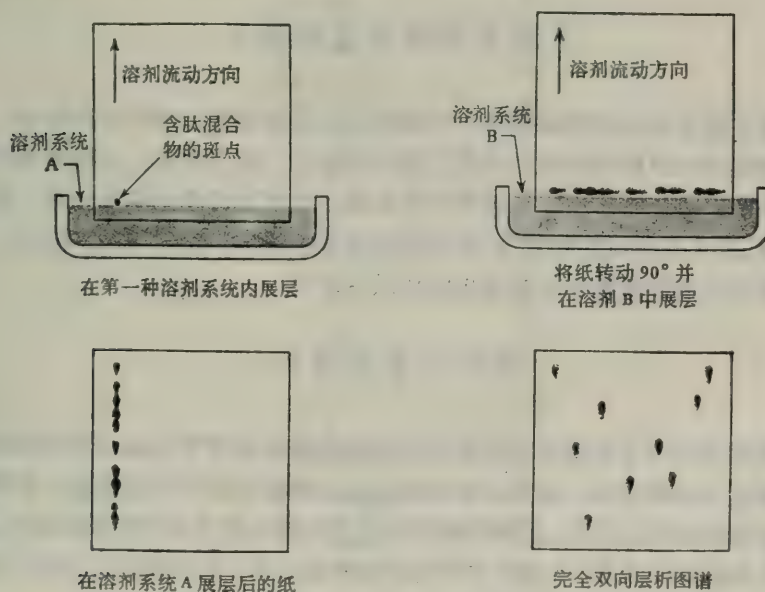


图 5-11 双向纸层析。将肽混合物点样后用溶剂系统 A 作一向展层,将纸晾干,转换 90°,再用溶剂系统 B 展层,使肽斑点满布全纸。可用图 5-19 为例说明。

## 肽片段的顺序分析

当多肽链部分水解所生成的全部肽片段都已经被分离后,将每一肽的样品进行完全水解,并测定其氨基酸组成。然后将另一样品依次用 Edman 降解法测定每一肽的氨基酸顺序。如果用此法测定顺序的肽段太长,可用上面已介绍过的方法鉴定 N-末端和 C-末端残基,然后用与第一次断链所用方法不同的某种方法,将此肽进一步断裂,而生成较短

的肽,就可按上述方法进行分析。

## 肽段排列次序

对原来肽链用两种方法断裂所得到的两套肽段只要已经分离获得,并且已确定全部肽段的氨基酸顺序,就可能从肽顺序的重叠推导出全部氨基酸顺序。其原理如图 5-12 所示。但是往往不能确定一个已知肽链的各个部份的明显重叠,因而需要对原来的肽链进行第三种或甚至第四种类型部份水解以获得所需的重叠。

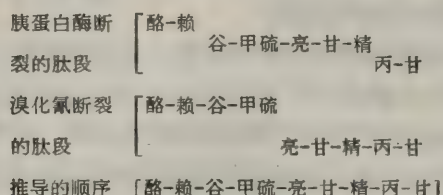


图 5-12 从肽链的重叠决定氨基酸顺序

## 双硫交联键位置的确定

在一种蛋白质多肽链的氨基酸顺序全部确定之后如果有二硫键存在的话,下一步就是要确定有哪些半胱氨酸残基配对形成了链内和链间二硫交联键。这通常是用胰蛋白酶部份水解蛋白质样品使它断裂而仍保持其交联键。按前述方法分离出含有二硫键的肽,还原其二硫键,烷化其生成的硫氢基,然后将从含有二硫基的每一碎片来的两个肽与用胰蛋白酶水解原有还原多肽链得来的肽相比较以鉴定之。

## 酰胺位置的确定

用酸或碱水解时天冬酰胺和谷氨酰胺残基的酰胺基将转变为氨而受到破坏,生成相应的天冬氨酸及谷氨酸残基,虽然从每克分子蛋白质酸水解所形成的氨分子数可以得出天冬酰胺及谷氨酰胺残基总数,但酰胺基的位置却不能从酸水解所得肽段推出,特别是那些既含有天冬氨酸和谷氨酸,又含有它们的酰胺的蛋白质,尤其如此。然而,用对酰胺基无作用的特异性蛋白酶处理所得到的肽段可以确定酰胺基的位置。

## 某些肽和蛋白质的氨基酸顺序

图 5-13 示牛胰岛素的全部氨基酸顺序,这是确定了氨基酸排列顺序的第一个蛋白质。它由两个多肽链组成: A 链有 21 个氨基酸, B 链为 30 个。胰岛素的两条多肽链通过两个双硫键连接起来,此外,还有一个链间双硫键。Sanger 将两链间及链内双硫键断裂,然后将 A 链与 B 链分离,在确定每条链的氨基酸顺序之后,又用前述方法确定了链间及链内交联的双硫键位置。



Sanger 的工作于 1953 年完成,开辟了作较长的多肽链顺序分析的途径。不久两个研究团体各自报道了促肾上腺皮质激素的氨基酸顺序。这是垂体前叶分泌的一种激素,能刺激肾上腺皮质分泌(图 5-14),这种激素由一条含 39 个氨基酸的单链组成,分子量 4,600,几年以后 S. Moore 及 W. Stein 在纽约完成了第一个酶蛋白核糖核酸酶的顺序分析。同时 C. B. Anfinsen 在贝塞斯达(Bethesda)也独立地作了重要的研究。核糖核酸

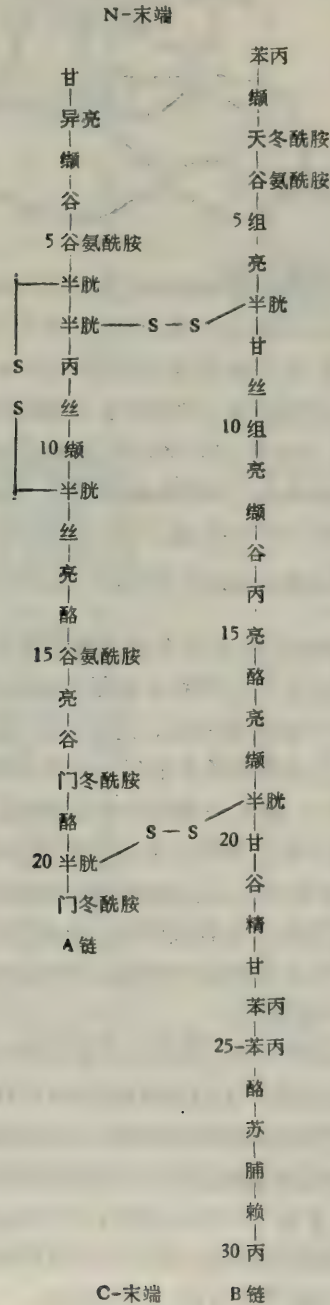
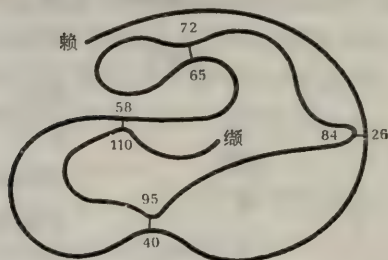


图 5-13 牛胰岛素的氨基酸顺序及 S—S 交联的位置

丝-酪-丝-甲硫-谷-组-苯丙-精-色-甘-赖-脯-缬-甘-赖-赖-精-精-脯-缬<sub>20</sub>-赖-缬-酪-脯-门冬-丙-甘-谷-门冬-谷氨酰胺-丝-丙-谷-丙-苯丙-脯-亮-谷-苯丙<sub>11</sub>,

图 5-14 人促肾上腺皮质激素的氨基酸顺序



赖-谷-苏-丙-丙-丙-赖-苯丙-谷-精-谷氨酰胺-组-甲硫-门冬-丝-丝-苏-丝-丙-丙-丝-丝-丝-门冬酰胺-酪-半胱-门冬酰胺-谷氨酰胺-甲硫<sub>29</sub>-甲硫-赖-丝-精-门冬酰胺-亮-苏-赖-门冬-精-半胱-赖-脯-缬-门冬酰胺-苏-苯丙-缬-组-谷-丝-亮-丙-门冬-缬-谷氨酰胺-丙-缬-半胱<sub>56</sub>-丝-谷氨酰胺-赖-门冬酰胺-缬-丙-半胱-赖-门冬酰胺-甘-谷氨酰胺-苏-门冬酰胺-半胱-酪-谷氨酰胺-丝-酪-丝-苏-甲硫-丝-异亮-苏-门冬-半胱-精-谷-苏-甘-丝-丝-赖-酪-脯-门冬酰胺-半胱-丙-酪-赖-苏-苏-谷氨酰胺-丙-门冬酰胺-赖-组-异亮-异亮-缬-丙-半胱-谷-甘-门冬酰胺-脯-酪-缬-脯-缬-组-苯丙-门冬-丙-丝-缬<sub>124</sub>

图 5-15 牛核糖核酸酶的氨基酸顺序。上图示链间双硫键位置。

酶是一条有 124 个氨基酸的单链,含有四个链间双硫键。(图 5-15)

第二个重要的里程碑是血红蛋白两种多肽链的氨基酸顺序鉴定(图 5-16)。它是第一个作了顺序分析的大低聚多链的蛋白质,这项工作是由两个研究室完成的,一个在美国,另一个在德国。血红蛋白含有四条多肽链,两条相同的  $\alpha$ -链(141 个残基)及两条相同的  $\beta$ -链(146 个残基)。在  $\alpha$ -链与  $\beta$ -链的许多部位上,有相同的氨基酸残基(图 5-16),即两条肽链具有所谓顺序同一性。具单一多肽链的肌肉蛋白质——肌红蛋白含有一个铁卟啉基,它类似血红蛋白能与氧结合,也与血红蛋白肽链有顺序同一性。至于在功能上类似的蛋白质或不同种属的同类蛋白质具顺序同一性的意义将在第六章讨论。

到目前为止,确定了全部氨基酸顺序的最长的多肽链是马的醇脱氢酶(374 个残基)及牛的谷氨酸脱氢酶(500 个残基)。

从很多球蛋白的氨基酸顺序分析,可作出少数审慎的概括。到目前为止,在球蛋白内没有发现周期性地反复频繁出现如 ABABABABAB·····或 ABCDABCDABCD·····样的重复顺序,单一氨基酸在一列上连续出现三次以上是很少见的,只有鱼精蛋白是例外,它有 4、5 及 6 个连续排列的精氨酸残基。因此在氨基酸顺序上很少明显的规律性。分析已知球蛋白的氨基酸排列顺序发现,所有或几乎所有可能重复的两三个氨基酸组成的短“顺序”都没有明显的周期性。链内出现的一 S — S — 交联键及其部位也没有任何规律可循;有的蛋白质内根本没有,有的则可能有好几个交联键。

另一方面,在某些纤维状蛋白质中有些氨基酸的确出现周期性的排列。胶原蛋白含





殊部位的一些氨基酸残基是不变的，即在一一切种属中都是相同的或仅偶而被置换。但是同类蛋白质链上通常大多数氨基酸残基是多变的。它们在种属与种属间的变异极为广泛，而且其中可以有几种不同的氨基酸相互置换。

从许多脊椎动物分离的胰岛素的氨基酸全顺序均已研究清楚，这些胰岛素的生物活性及分子量基本上都是相同的。人、猪、狗、兔及鲸鱼的胰岛素A链都是相同的，而牛、猪、狗、鲸、绵羊、山羊及马的胰岛素B链也相同。人与象的胰岛素B链也是相同的。在A链的8、9、10位置处常常发生氨基酸的置换，这就是形成链内交联的两个半胱氨酸残基部位。然而，在4、13、14、15及18位置处也有氨基酸的置换。进一步研究不同种属动物胰岛素的顺序发现，在A<sub>8</sub>处，丙、组和苏氨酸可以互相置换；在A<sub>9</sub>处，丝、精、赖、天冬酰胺及甘氨酸可互相置换；在A<sub>10</sub>处，缬、异亮、脯及苏氨酸也可互相置换。将在以后讨论到，这种特异的氨基酸置换与基因密码的组成有关。

胰岛素只在脊椎动物中才有，而在低等动物、植物及细菌中显然没有。因为这个原因，加之胰岛素是一个较小的分子，所以不适于用来研究氨基酸顺序与动植物分类之间可能存在的关系。从这个角度来说，电子传递蛋白细胞色素c是比较适合，因它存在于一切动物、植物及需氧微生物中。陆上脊椎动物的细胞色素c由一条单链组成，含104个氨基酸；在鱼类为107个，在绿色植物为111或112个，在酵母及霉菌中为107个到109个。E. Margoliash及其共同工作者从50种以上不同种属中提取的细胞色素c，全面研究了它们的氨基酸顺序的变异。其中有27种氨基酸是完全无变异的（图5-17）。这些氨基酸不规则地分散在多肽链各部位，但有七个是出现在第70—80位。除一种外，所有种属中的第14及第17位的半胱氨酸残基是卟啉环连接的部位，这也是不变异的，而上述例外的唯一种属在第14位为丙氨酸。显然，这些半胱氨酸对于细胞色素c的结构与功能是重要的。在这50种细胞色素c中除了完全无变异的残基外偶有几种氨基酸可被置换，而且只被一种另外的氨基酸置换。种属间变

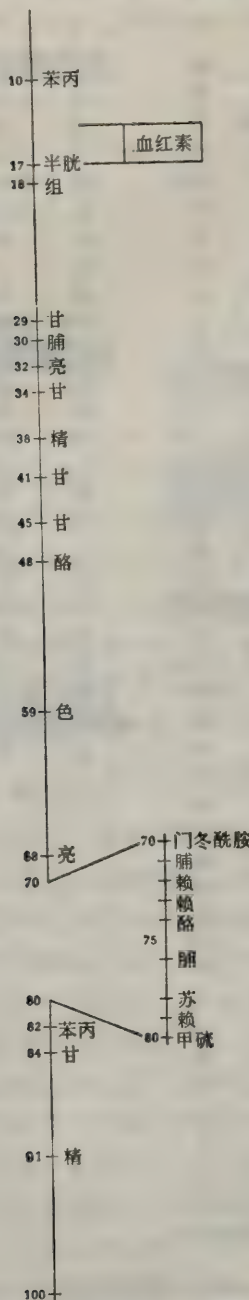


图5-17 真核生物细胞色素c的27种无变异的氨基酸。比较了50种不同的细胞色素c，它们是：14种哺乳动物，4种鸟，2种爬行动物，1种两栖类，5种鱼，4种昆虫，5种霉菌，11种高等植物，2种面包酵母。若研究的种属增加时，不变异的氨基酸数可能会减少。[仿改 E. Margoliash in B. Chance and R. Estabrook (eds.) Hemes & Hemoproteins, p. 373, 1966]



异氨基酸数与它们种属进化的差异大致成比例，种属差异大的马与酵母细胞色素 c 分子上有 48 个氨基酸不同，而进化极相近的鸭与鸡的细胞色素 c 则仅有两个氨基酸不同。普通鸡与吐绶鸡的细胞色素 c 是完全相同的；猪、牛及绵羊的完全相同。

已经用许多种属的细胞色素 c 的氨基酸变异数来绘制一个种属发生树。这不仅可表示细胞色素 c 的生物进化过程，而且也可能从它预计生物的主要种及属发生的可能时间。(图 5-18)



图 5-18 表示细胞色素 c 进化过程的种属发生树。这是用计算机从许多种属的细胞色素 c 氨基酸排列顺序计算绘制的。每一个圆圈表示一种细胞色素 c 的顺序是从该圈发出的各分支种属的祖先，每一分支旁边的数字表示从祖先的每 100 个氨基酸中的变异残基数。因此绿豆的细胞色素 c 与它的祖先比较，每 100 个氨基酸中有 5 个不同，而芝麻细胞色素 c 则每 100 个中只有 2 个不同。(引自 M. O. Dayhoff, C. M. Park, and P. J. McLaughlin, in M. O. Dayhoff (ed.), Atlas of Protein Sequence and Structure, Vol. 5, p. 8, 1972)

### 有关的蛋白质的进化

氨基酸顺序研究揭示某些蛋白质可能在进化上来自于一个共同的祖先。我们已经了解肌红蛋白的单条多肽链与 Hb-A 的四条多肽链具有相当多的顺序同一性，两种蛋白都有在它们的亚铁血红素基团上可逆地与氧结合的功能，前者在肌肉内而后者在红细胞内。

往后还会知道肌红蛋白多肽链的立体构型与血红蛋白 $\alpha$ 及 $\beta$ 链的构型极相类似。有可能肌红蛋白和血红蛋白都来自于一个共同的祖先,这个祖先很可能具有一条单链及一个单纯的亚铁血红素基团。

另一对为人们所熟知的像堂兄弟般的蛋白质——胰蛋白酶和糜蛋白酶; H. Neurath和他的同事曾指出两者的氨基酸顺序甚为相似。胰蛋白酶和糜蛋白酶都是胰腺合成的消化酶,也都以无活性的胰蛋白酶原和糜蛋白酶原形式分泌,然而它们的底物特异性却差别很大。在糜蛋白酶的全部氨基酸中有41%与胰蛋白酶的位置相同,而且糜蛋白酶的五个双硫键与胰蛋白酶的六个双硫键有四个处于同样的位置上。

有时功能明显不同并且分布也绝然不同的两种蛋白质却表现出明确无误的顺序一致性。R. L. Hill及其同事发现 $\alpha$ -乳清蛋白(一种乳蛋白)的124个残基中有54个与鸡卵清中溶菌体酶相同。这种似乎无关的蛋白质确有一种共同来源: $\alpha$ -乳清蛋白是乳糖合成酶的一个调节亚基,此酶能从组成乳糖的单糖合成乳糖(乳汁中的糖),而溶菌酶则能水解细菌壁中的多糖链。所以两种酶都能激活糖基。

还有另一个有趣的例子是胰岛素(图5-13),与神经生长因子具有氨基酸顺序的一致性。后者是哺乳类颌下腺中的一种蛋白质,它极大地促进某些神经节的生长。这种发现提示,在这些内分泌腺和分泌腺与它们的分泌作用方式之间存在着进化上及功能上可能的联系。

## 基 因 复 制

研究氨基酸顺序还证明了蛋白质进化上的另一个重要原则——基因复制。最简单的例子是细菌的铁氧还蛋白(ferredoxin),一种含铁的电子传递蛋白,它的多肽链含有55个氨基酸。这种多肽链的两半彼此具有明显的氨基酸一致性,表明整个分子的基因是在进化中从为约28个氨基酸的半分子编码的单个基因复制而成的。还有一种高等植物的铁氧还蛋白的多肽链比细菌中的长一倍,说明在这种较高形式的进化中,发生了基因进一步延长和融合。

肌红蛋白与血红蛋白族可能具有一条共同的单链祖先,它们也有基因复制,现代八目鳗血液中的血红蛋白只有一条多肽链和一个亚铁血红素,这是唯一已知具单链血红蛋白的种属,这一发现符合上述观点。因此设想血红蛋白单链祖先的基因曾经被复制过,并导致形成现代血红蛋白的 $\alpha$ 链和 $\beta$ 链各自的基因,而 $\alpha$ 链和 $\beta$ 链表现出值得注意的顺序一致性(图5-16)。免疫球蛋白的多肽链在进化上也有基因复制,将在第三十五章讨论。

## 同一种属内氨基酸顺序的突变

人类镰状细胞贫血的红细胞在氧张力低时呈镰刀状,亦即红细胞形状类似新月形而不是正常的扁平盘状(图5-19)。从镰状细胞来的血红蛋白的电泳移行率与正常血红蛋白稍有不同。

化学研究表明,镰状细胞血红蛋白(血红蛋白S)与正常血红蛋白(血红蛋白A)仅仅有一个氨基酸残基不同。两者的 $\alpha$ -链是相同的,但正常血红蛋白 $\beta$ 链第6位的谷氨酸



在血红蛋白 S 中被缬氨酸置换。血红蛋白 S 第 1 位及第 6 位的两个缬氨酸形成一种疏水联合,使其分子构型发生变化,并以一定方式聚合起来,导致红细胞本身的形状发生扭曲。因此镰状细胞贫血是一种遗传性分子病;其氨基酸置换是由于合成血红蛋白  $\beta$ -链密码的 DNA 分子突变的结果。

血红蛋白 S 是按照简单的孟德尔定律进行遗传的。多数在红细胞中有血红蛋白 S 的人都是杂合子,他们携带一个正常血红蛋白基因和一个血红蛋白 S 基因,其红细胞中既有正常血红蛋白,也有血红蛋白 S;一般称这些人具有镰变细胞特征。少数人称为纯合子,携带有两个血红蛋白 S 基因;这种人则系镰状细胞贫血患者,他们的红细胞中只含血红蛋白 S。虽然每十个具非洲血统的美国人中就有一个是血红蛋白 S 杂合子,但 4,000 个人中只有一个是纯合子。大多数纯合子人在 30 岁以前就死于镰状细胞贫血。镰状细胞的寿命只有正常细胞的一半因而导致贫血,而且由于血红蛋白 S 的立体结构异常这些细胞常聚集在一起,特别是在缺氧的时候,这种聚集的红细胞块可堵塞供应生命重要部位血液的毛细血管,因而造成临床危象。另一方面杂合子则可生活得相当正常。有趣的是红细胞具镰状细胞特征的人对疟原虫的感染有抵抗力,因此对于生活在疟疾仍然流行的非洲地区的人们来说还有好处。很多具正常血红蛋白的非洲婴儿死于脑型疟疾,但有镰状细胞特征的婴儿则有抵抗力。

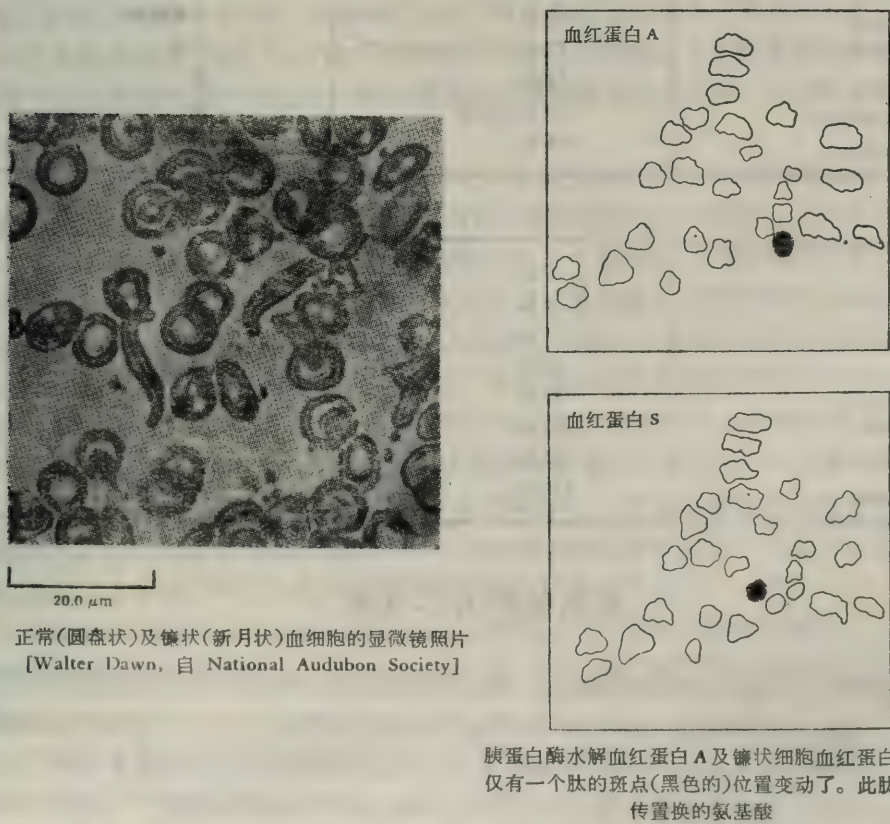


图 5-19

在人类中总共发现约有 150 种不同的变异型血红蛋白。变异型蛋白中被置换的特定

氨基酸很容易用肽谱技术鉴定测出(图 5-11)。差不多所有已经发现的变异型血红蛋白的遗传改变都只在  $\alpha$ -链或  $\beta$ -链上有单独一个氨基酸被置换。表 5-5 列出人血红蛋白中已发现的某些变异类型; 这些异常血红蛋白常以发现地名命名。在台湾, 用电泳法检查 100,000 居民的血红蛋白发现 165 人有异常血红蛋白。由于平均每三种异常血红蛋白中只有一种能用此方法检查出来, 因此作出推论认为大约每 1,000 个人中有 5 人携带有变异型血红蛋白。

某些血红蛋白的突变是可致死的。因为氨基酸置换造成了有功能缺陷的血红蛋白分子。患者可能无法活到成年。另一方面有些变异对血红蛋白生理功能损害较轻, 还有一些则显然是无害的。这种变异不局限于血红蛋白; 很可能在所有生命机体中各种类型蛋白质都可因突变而发生变异, 其中有些突变是有益的, 有些则有害。许多无害的变化随着进化过程而明确地传递给了蛋白质。

表 5-5 人血红蛋白中氨基酸的置换

异常血红蛋白	位置及正常氨基酸	置 换
$\alpha$ 链		
I	16 赖	谷
C <sub>Honolulu</sub>	30 谷	谷氨酰胺
Norfolk	57 甘	天冬
M <sub>Boston</sub>	58 组	酪
G <sub>Philadelphia</sub>	68 天冬酰胺	赖
O <sub>Indonesia</sub>	116 谷	赖
$\beta$ 链		
C	6 谷	赖
S	6 谷	缬
G <sub>San Jose</sub>	7 谷	甘
E	26 谷	赖
M <sub>Saskatoon</sub>	63 组	酪
Zürich	63 组	精
M <sub>Milwaukee</sub>	67 缬	谷
D <sub>Punjab</sub>	121 谷	谷氨酰胺

多肽链的人工合成

长肽链的人工合成具有特殊的意义, 因为它涉及的技术难度大而且对此又采用了精巧的方法。最基本的困难是合成肽键所用的试剂也能与氨基酸分子上不参预形成肽键的其他功能基团起反应, 如 N-末端的游离氨基、C-末端的游离羧基、或某些 R-基团, 如半胱氨酸的巯基等。因此必须首先用适当的反应屏障或保护这些敏感基团, 以防止它们与肽键形成试剂起反应(图 5-20)。在肽键形成以后又必须除去这些保护性的屏障基团。因此, 在多肽合成过程中每增加一个氨基酸残基, 为加上及除去屏障基团都需要有好几个



反应步骤。很明显，若要合成一条有任何长度的多肽链每一步骤的产量都必须是相当高才行。

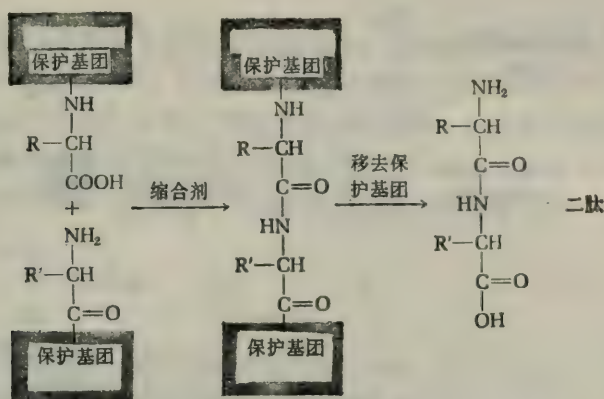


图 5-20 一个氨基被保护的氨基酸和一个羧基被保护的氨基酸缩合成为二肽，然后除去保护基生成游离的二肽。

本世纪初 Emil Fischer 合成了多达 16 个残基的多肽链，但还没有能合成天然存在的多肽，直到 1953 年 V. du. Vigneaud 及其同事成功地合成了催产素及加压素，它们都含有 9 个氨基酸残基（图 5 2）。此后不用酶而用化学方法合成了一些其他活性多肽，如血压调节激素缓激肽（9 个残基）、促  $\alpha$ -黑色素细胞激素（24 个残基）及促肾上腺皮质激素（39 个残基）（图 5 14）。

R. B. Merrifield 及其同事发展了一种化学合成多肽的巧妙的方法即固相技术。此方法将 C-末端氨基酸以共价结合在一种不溶性的树脂颗粒上，树脂颗粒要足够大能借过滤使与液相分离开来，这样，从 C-末端氨基酸开始，一个残基一个残基地连接起来以合成多肽链。多次重复反应加入的过量试剂可以通过过滤及用适当溶剂洗涤树脂而除去，这都是些简单操作，可用自动程序机器进行。全部反应在单一反应室内进行，从贮液并通过量泵自动地加入试剂。当肽链合成后，再用一种不会破坏新合成肽键的反应将它从用于固定的树脂上断裂下来（图 5 21）。由于在每次反应间只需简单的过滤和洗涤，而且每步的中间产物也不需要分离提纯，所以这样操作的每一步骤的产量极高，相对地费时也较少。

多肽链的合成（图 5-21）开始是将待合成肽链的 C-末端氨基酸羧基结合到不溶性树脂颗粒上。再用叔丁基氧碳酰氯封闭下一个待接的氨基酸的氨基，然后使之在缩合剂二环己基碳化二亚胺作用下与羧末端氨基酸残基的游离氨基起反应（图 5-23）。此反应形成一个封闭了氨基的二肽，此二肽通过 C-末端羧基与不溶性树脂共价连接。再通过酸化将封闭氨基的化学基团除去，并变成气体产物二氧化碳及异丁烯。此步骤反复进行多次。

Merrifield 及其同事用这种自动方法合成了九肽缓激肽，27 小时内得率为 85%，故平均合成速率为每一肽键约需 3 小时。用同样方式也合成了胰岛素的两条链；A 链（21 个残基）只要 8 天，而 B 链（30 个残基）为 11 天，他们也合成了牛胰核糖核酸酶（124 个残基）。总得率为 18%。与此同时另外一组研究工作者用一种略有不同的方法合成了核糖核酸酶；他们先合成核糖核酸酶肽链的各个片段，然后将它们连接起来。

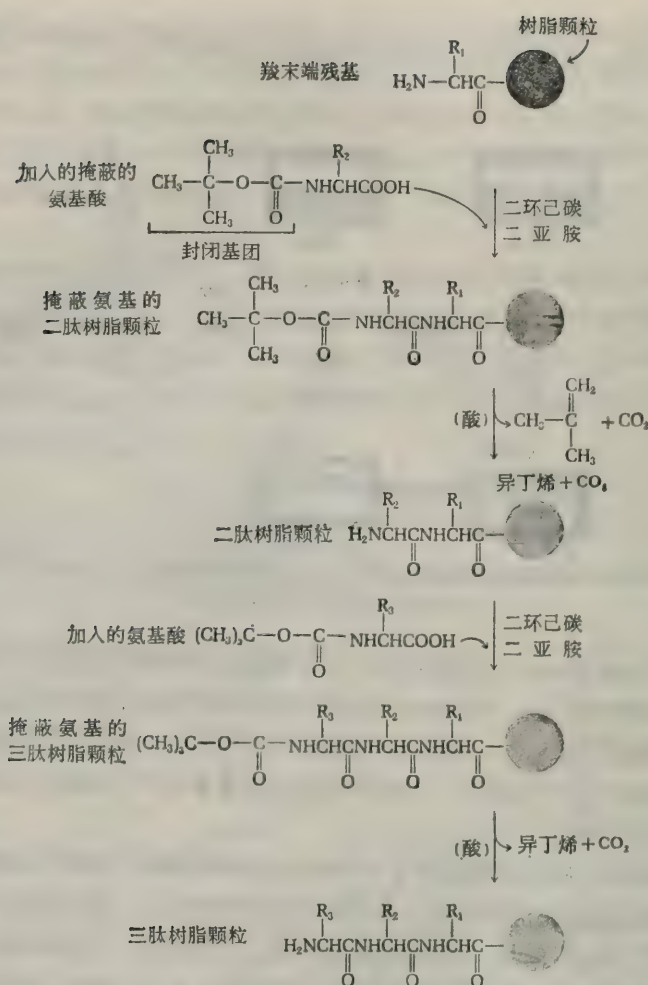


图 5-21 一个三肽的固相合成步骤。肽链的合成是通过连续地将氨基酰基加到结合在树脂颗粒上的 C-末端氨基酸上。用叔丁氧羰基保护氨基，酸化时此物很容易形成挥发性物质而被除去。重复上述步骤可以合成很长的肽链。最后将合成的肽从树脂上断裂下来。

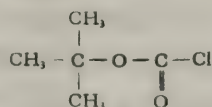


图 5-22 叔丁氧羰基氯，一种氨基掩蔽剂。它很容易形成气态产物而被除去

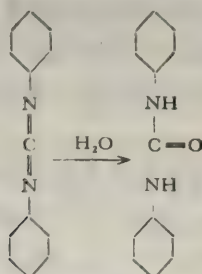


图 5-23 二环己基碳二亚胺是一种强缩合剂，它从两个氨基酸缩合时脱下一个分子水，本身就与水化合成二环己脒。



## 氨基酸同聚物

合成只含一种氨基酸的很长肽链是很容易的。这种肽链称为同聚肽。例如多聚甘氨酸、多聚丙氨酸及多聚谷氨酸等。所用方法为比较简单的聚合反应,可自动持续进行。同聚物的长度可由反应起始物的本质、温度及溶剂所控制。氨基酸同聚物虽然在自然界没有发现,但在研究影响多肽链结构和行为的各种参数时却是一种非常有价值的模式化合物。例如通过它们对多肽的旋光性与二级结构的关系已获得重要的了解。(第六章)

### 摘 要

肽键是多肽链骨架上相邻氨基酸唯一的共价连接。多肽的酸碱行为是其离解的 N-末端氨基、C-末端羧基以及 R-基团的函数。用与酸煮沸或与酶作用使多肽链部份水解生成小肽混合物。可用层析或电泳法分离。完全水解蛋白质生成的所有氨基酸都是游离形式。不是一切蛋白质含有全部氨基酸,也不是各种氨基酸出现的频率都相等。

要测定一种蛋白质的氨基酸排列顺序,首先要分离其肽链,接着将双硫键还原成为巯基,再将半胱氨酸残基烷化。然后鉴定肽链的 N-末端和 C-末端氨基酸,以及测定它的完全水解物的氨基酸全部组成。再用胰蛋白酶水解一个肽链样品,胰蛋白酶水解由赖氨酸或精氨酸构成羧基碳原子的肽键。分离用胰蛋白酶水解的肽碎片,测定其氨基酸含量,并用 Edman 降解法测定其氨基酸顺序。取另一个完整的多肽样品,用另一方法断裂。用糜蛋白酶、胃蛋白酶或溴化氰法可以得到一组不同的肽碎片,象第一次断裂后一样进行分离和分析。从两组肽碎片的“重叠”可推导出原来蛋白质中肽段的排列顺序。

每种蛋白质都有其特征性的氨基酸顺序,并且一种已知蛋白质的所有分子的氨基酸顺序都是相同的。不同种属中功能相同的蛋白质,如血红蛋白及细胞色素,在肽键的某些不变异的位置上具有相同的氨基酸残基,而另外一些残基在不同种属中可有不同。两个种属差距愈远,则在可变异的位置上变异氨基酸的数目愈多,这一事实使我们能绘制种属发生树。某些功能不同的蛋白质却在氨基酸顺序的一致性方面表现有相互关系,如胰蛋白酶及糜蛋白酶,在蛋白质进化过程中它们的基因常出现长度加倍或基因复制。已研究出多肽链化学合成的有效方法,并用化学方法已合成了几种多肽及一种酶。它们的生物活性证实了用分析方法研究所知道的这些蛋白质结构都是正确的。

### 参 考 文 献

#### 书籍

- Bailey, J. L.: *Techniques in Protein Chemistry*, 2d ed., American Elsevier, New York, 1967. A valuable compendium of laboratory procedures.
- Dayhoff, M. O.: *Atlas of Protein Sequence and Structure 1972*, National Biomedical Research Foundation, Washington, D.C., 1972. A complete atlas of amino acid sequences of proteins, with much interesting information on species differences, evolutionary relationships and the genetic code for amino acids, as well as transfer RNA sequences.
- Dickerson, R. E., and I. Geis: *The Structure and Action of Proteins*, Harper & Row, New York, 1969. An illuminating and brilliantly illustrated short account.
- Haschemeyer, R. H. and A. E. V. Haschemeyer: *Proteins: A Guide to Study by Physical and Chemical*

*Methods*, Wiley, New York, 1973. Convenient, short handbook of methodology.

Means, G. E., and R. E. Feeney: *Chemical Modification of Proteins*, Holden-Day, San Francisco, 1971.

Neurath, H. (ed.): *The Proteins: Composition, Structure and Function*, 2d ed., vols. 1—5, Academic, New York, 1963—1970, Collection of detailed reviews.

Stewart, J. M., and J. D. Young: *Solid-Phase Peptide Synthesis*, Freeman, San Francisco, 1969. A short handbook of laboratory methods.

## 论文

- Edelman, G. M., B. A. Cunningham, W. E. Gall, P. D. Gottlieb, V. Rutishauser, and M. J. Wardel: "The Covalent Structure of an Entire  $\gamma$ G Immunoglobulin Molecule," *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 63: 78—85 (1969).
- Edman, P., and G. Begg: "A Protein Sequenator," *Eur. J. Biochem.*, 1: 80—91 (1967). Automated equipment for sequence determination.
- Frazier, W. A., R. H. Angeletti, and R. A. Bradshaw: "Nerve Growth Factor and Insulin," *Science*, 176: 482—488 (1972).
- Gutte, B., and R. B. Merrifield: "The Total Synthesis of an Enzyme with Ribonuclease A Activity," *J. Am. Chem. Soc.*, 91: 501—502 (1969).
- Hall, D. O., R. Cammack, and K. K. Rao: "The Plant Ferredoxins and Their Relationship to the Evolution of Ferredoxins," *Pure Appl. Chem.* 34: 553—577 (1973).
- Hartley, B. S.: "Strategy and Tactics in Protein Chemistry," *Biochem. J.*, 119: 805—822 (1970). A personal account of the problems encountered in analysis of amino sequence of proteins.
- Margoliash, E.: "The Molecular Variations of Cytochrome *c* as a Function of the Evolution of Species," *Harvey Lect.*, ser. 66, p. 177, Academic, New York, 1972.
- Moon, K., D. Piskiewicz, and E. L. Smith: "Glutamate Dehydrogenase: Amino Acid Sequence of the Bovine Enzyme and Comparison with That from Chicken Liver," *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 69: 1380—1383 (1972).
- Moore, S., and W. H. Stein: "Chemical Structures of Pancreatic Ribonuclease and Deoxyribonuclease," *Science*, 180: 458—464 (1973). Combined text of the Nobel prize lectures by the authors.
- Neurath, H., K. A. Walsh, and W. P. Winter: "Evolution of Structure and Function of Proteases," *Science*, 158: 1638—1644 (1967). Evolutionary relationships between proteolytic enzymes secreted into the digestive tract.
- Sanger, F. and E. O. P. Thompson: "The Amino Acid Sequence in the Glycyl Chain of Insulin," *Biochem. J.*, 53: 353—374 (1963). This paper and the one below describe the classical work in protein sequencing.
- Sanger, F., and H. Tuppy: "The Amino Acid Sequence in the Phenylalanyl Chain of Insulin," *Biochem. J.*, 49: 463—490 (1961).

## 习题

- (a) 试讨论胰蛋白酶对下列多肽的作用, 然后用 2,4-二硝基氟苯处理酶水解生成的每一碎片;  
(b) 再水解肽键, 试列举所得的各种 2,4-二硝基苯 (2,4-DNP) 氨基酸。
  - 赖-天冬-甘-丙-丙-谷-丝-甘
  - 丙-丙-组-精-谷-赖-苯丙-异亮
  - 酪-半胱-赖-丙-精-精-甘
  - 苯丙-丙-丙-谷-丝-丙-甘
- (a) 列举用糜蛋白酶处理下列多肽所形成的肽片段。缬-丙-赖-谷-谷-苯丙-缬-蛋-酪-半胱-谷-色-蛋-甘-甘-苯丙。  
(b) 如再用溴化氰处理这些肽片段又可得哪些产物? 试列举之。
- 试列出所形成的肽片段 (a) 用胰蛋白酶水解下列多肽; (b) 用嗜热菌蛋白酶处理酶水解的肽片段。
 

亮-蛋-组-酪-赖-精-丝-缬-半胱-丙-赖-天冬-甘-异亮-苯丙-异亮
- (a) 你将如何处理下列多肽链以获得两组具有适当重叠的肽段, 因而能够确定其完整的氨基酸顺序? (b) 写出两种方法所得肽段的氨基酸顺序。



甘-亮-丝-脯-苯丙-组-苏-天冬-缬-丝-丙-丙-色-甘-谷-缬-甘-丙-组-亮-甘-谷-酪-甘-丙-谷-丙-苏-谷

5. 一种四肽与 2,4-二硝基氟苯反应后用 6 N HCl 水解, 得到缬氨酸的 2,4-二硝基苯衍生物及另外三种氨基酸; 用胰蛋白酶水解该四肽的另一个样品得两个肽段。将其中之一用  $\text{LiBH}_4$  还原再水解之。水解产物中可检出相当于甘氨酸的氨基醇以及一种能和茚三酮反应呈黄色的氨基酸。写出此四肽的氨基酸的可能顺序。

6. 分析下列肽段在 pH 1.9, pH 3.0, pH 6.5, 及 pH 10.0 下进行纸电泳时的移行方向 (即: 不动 [O]; 移向阴极 [C]; 移向阳极 [A])。

(a) 赖-甘-丙-甘; (b) 赖-甘-丙-谷; (c) 组-甘-丙-谷; (d) 谷-甘-丙-谷; (e) 谷  $[\text{NH}_2]$ -甘-丙-赖。

7. 如果第六题中的五个肽的混合物, 在 Dowex-1 (一种阳离子交换树脂) 的离子交换柱上以 pH 从 10→1.0 连续变化的缓冲系统作洗脱, 试分析每种肽洗脱的相对次序。

8. 指出下述异常血红蛋白在 pH 7.0 时电泳向阴极的移行率与正常人血红蛋白有何不同:

(a) HbS; (b) HbI; (c) HbE; (d) HbMmilwaukee; (e) HbZurich。

9. 从一个多肽链得出下列结构数据。全水解得甘、丙、缬、亮、异亮、半胱、天冬、谷、丝、酪。用 2,4-二硝基氟苯处理肽链后用酸水解得 2,4-DNP 甘氨酸; C-末端分析得天冬氨酸、部份酸水解得下列寡肽, 其中有: 半胱-半胱-丙, 谷-天冬-酪, 谷-谷-半胱, 谷-亮-谷, 半胱-天冬, 酪-半胱, 丝-缬-半胱, 谷-半胱-半胱, 丝-亮-酪, 亮-酪-谷, 甘-异亮-缬-谷-谷。用胃蛋白酶水解断裂生成一种肽, 此种肽水解可得到丝-缬-半胱及丝-亮。根据此数据写出其结构。

10. 一个由赖、组、天冬、谷、丙、异亮、缬及酪所组成的 A 肽, 作 N-末端分析与 DNFB 反应生成 DNP 天冬氨酸。用羧肽酶水解第一个产物为游离缬氨酸, 用胰蛋白酶消化 A 肽得到两个肽。一个含赖、天冬、谷、丙及酪, 另一个(组、谷、异亮、缬)用 DNFB 作 N-末端分析生成 DNP 组氨酸。用嗜热菌蛋白酶断裂后者, 并用 DNFB 处理产物得 DPN 谷氨酸与 DNP 组氨酸。从肽 A 也能生成两个糜蛋白酶水解的肽, 一个含天冬、丙及酪, 另一个含赖、组、谷、异亮及缬, 试推导肽 A 的结构。

11. 假定有 1 mM 的五肽酸水解生成 2 mM 谷氨酸、1 mM 赖氨酸、没有能够定量回收其它氨基酸, 将原来的五肽用胰蛋白酶裂解成两个肽段, 在 pH 7.0 进行电泳, 一个肽段移向阳极, 另一个则移向阴极。用 DNFB 处理胰酶水解的一个肽段继以酸水解, 生成 DNP-谷氨酸。用糜蛋白酶处理原来五肽生成两个肽段及游离谷氨酸。试从上述数据写出该五肽的氨基酸顺序。

12. 用酸水解一种假定的六肽, 定量地回收到甘氨酸及另一氨基酸, 用赖氨酸掩蔽试剂处理该六肽, 再用胰蛋白酶处理生成的产物, 在不同的层析和电泳系统中均只有一个单一的斑点, 但是其移行率与未经处理的六肽不同。用糜蛋白酶处理原来的六肽, 生成的产物有一种具紫外吸收的游离氨基酸。试从上述数据列出该六肽的氨基酸顺序。

[袁恬莹译 朱定尔校]

## 第六章 蛋白质：三维构象

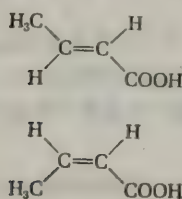
现在我们将讨论一个有关蛋白质研究的中心问题、亦即对活细胞的分子逻辑具有基本意义的问题。我们已经知道,遗传信息是贮存在一种直链的单向的密码中,它们以特定的碱基顺序的形式存在于长链状的脱氧核糖核酸分子内。蛋白质也是由长链组成,其中的氨基酸以特定直链顺序而存在。然而我们知道,在每一类型的蛋白质,它的多肽链折叠成特定的三维构象,这是它的特殊生物学功能或作用所必需的。在多肽链的氨基酸顺序中固有的直链或单向遗传信息,又是如何转译成天然蛋白质分子特有的三维构象呢?

现代生物学研究中最有意义的一些进展,回答了这个问题。由于采用物理化学的方法观测纯品蛋白质,才使我们获得一些发现,从而阐明了蛋白质的功能和比较生物学。

### 构型和构象

首先,我们必须分清两个经常混淆的名称。构型系表示在立体异构体中其取代基团的空间排列(图 6-1),在未断裂一个或多个共价键时,这些结构不能相互转变。构象是指那些无需键断裂却能自由地表现许多不同的位置的取代基团的空间排列,这是因为它们

几何(顺-反)异构体



旋光异构体

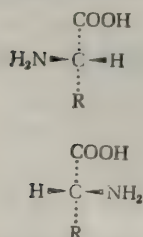
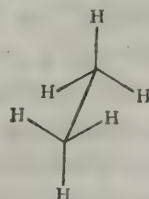
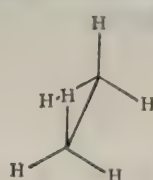


图 6-1 立体异构体的构型。共价键未断裂时,这些异构体不能相互转变。

顶端观察图

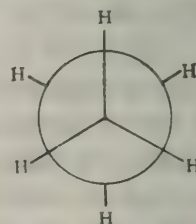


交错构象

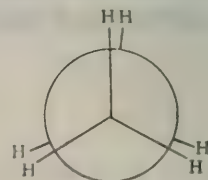


重叠构象

末端观察图



交错构象



重叠构象

图 6-2 乙烷的构象。通过围绕单键的旋转,不同的构象形式可以迅速相互转变,但不能将它们相互分开。

可围绕分子中的单键而旋转。例如在碳氢化物乙烷,我们可以期待围绕其 C—C 单键会发生完全自由的旋转,因而产生了无限数目的分子构象。但是,交错构象(图 6-2) 远较所有其他构象稳定,因而属于主要构象,而重叠形式最不稳定。



在形式上,一条多肽链的共价主链是单键连接的。因而我们可以想象,多肽链的主链有无数数目的可能构象,而且由于热运动,任一已知多肽链的构象遭受了经常不停的变化。然而现在已知,在温度和pH的正常生物学条件下,一种蛋白质的多肽链仅有一个(或非常少的)构象,这就是具有生物活性的天然构象。天然构象相当稳定,因此能将蛋白质分离出来并保持其天然状态。所以这一事实提示,天然蛋白质主链中的单键不能自由旋转。

## 纤维状蛋白

首先我们将考虑纤维状蛋白的构象。特别是在较高级动物中,它们的存在不仅非常丰富,而且它们的构象较球状蛋白简单,因为它们的多肽链经常以平行束方式沿着一个方向排列或盘绕。因此,这就使某些纤维状蛋白的多肽链构象较易用实验方法检查;实际上,有关蛋白质多肽链主链上的单键自由旋转的约束程度,第一个重要线索就是纤维状蛋白提供的。

在这里我们讨论纤维状蛋白中两类主要的蛋白质——角蛋白和胶原。角蛋白的研究在揭示天然蛋白质中多肽链最普遍的构象,即 $\alpha$ 螺旋和 $\beta$ 构象方面,起了特殊重要的作用。

## 角 蛋 白

角蛋白是纤维状和不溶性的动物蛋白质,来源于外胚层(皮肤)细胞。它们包括皮肤(皮革几乎是纯角蛋白)以及外胚层的生物衍生组织如毛发、羊毛、鳞屑、羽毛、羽茎、指甲、蹄、角和丝等的结构蛋白质成分。角蛋白有两类。 $\alpha$ -角蛋白比较富于胱氨酸残基,因而含有许多双硫交联桥;另外,它们含有绝大部分的常见氨基酸。 $\alpha$ -角蛋白包括角质与指甲的坚硬而易脆的蛋白质以及皮肤、毛发和羊毛等较软而柔韧的角蛋白,前者的胱氨酸含量很高(可达22%),而后者大约含10—14%的胱氨酸。在另一方面, $\beta$ -角蛋白则不含有半胱氨酸或胱氨酸,但富含带小侧链的氨基酸,特别是甘氨酸、丙氨酸和丝氨酸。 $\beta$ -角蛋白存在于蜘蛛和蚕吐丝的丝纤维,以及爬行类和鸟类的鳞片、爪和喙喙中。两类角蛋白的另一个重要的差别是,当加热时 $\alpha$ -角蛋白会伸展,例如当毛发暴露在湿热中时,其长度将伸展到几乎为原有的两倍,而冷却时又回缩到正常的长度。在这些条件下 $\beta$ -角蛋白并不能伸展。

电子显微镜已经揭示,毛发和羊毛纤维含有粗原纤维束,而构成每一束的较细原纤维,又是由沿着单轴排列的蛋白质细丝的平行束依次组成。这种结构特点使我们容易用X射线衍射分析进行检查。

## 角蛋白的X射线分析

研究围绕着每个原子的电子使已知波长的X射线进行散射或衍射的角度和强度,即能测定在晶体内规则重复的原子或分子单位的间隔。那些具有最高电子密度的原子,如重金属原子,使X射线衍射最多;而电子密度最低的原子(如氢原子),则使X射线衍射最

少。像 NaCl 这类盐的晶体的 X 射线分析比较简单, 因为仅涉及到两种不同的原子, 并且它们的间隔规则。在理论上, 复杂的有机分子晶体, 甚至非常大的分子如蛋白质, 同样也能以 X 射线衍射法进行分析, 但是这种衍射图谱的数学分析是非常复杂的, 因为这种分子中的大量原子可产生几千个衍射点。

远在廿世纪三十年代早期, Astbury 在英国首次完成了蛋白质的 X 射线研究。毛发、羊毛和  $\alpha$ -角蛋白类的某些其他纤维状蛋白都显示了相似的 X 射线图谱。图谱表明, 这些蛋白质沿着它们的长轴具有 0.5 到 0.55 毫微米的大周期或重复单位。他的观察进一步提出, 这一族纤维状蛋白的多肽链并不是充分伸展的, 而是以某种有规则的方式盘旋或卷曲, 因为充分伸展的多肽链是不会具有已见到的那种间隔的。另一方面, 丝纤维的  $\beta$ -角蛋白——丝心蛋白的 X 射线衍射图谱明显不同, 它符合重复单位为 0.7 毫微米的构型。有意义的是, 当毛发或羊毛经蒸汽处理伸展后, 它们的 X 射线图谱即与  $\beta$ -角蛋白相似, 也具有 0.65—0.7 毫微米的周期。Astbury 作出结论: 在  $\alpha$  和  $\beta$  角蛋白中, 多肽链是以不同的方式盘旋或卷曲着。

我们得到的有关角蛋白结构的知识, 其第二阶段的进展, 来自 Pauling 和 Corey 在美国所作的工作。他们记录了氨基酸和单纯二肽和三肽等晶体的 X 射线衍射图谱, 从而推论出肽键的精确结构。他们发现, 肽键的 C—N 键, 较绝大多数的其他 C—N 键为短。他们得出结论称, 这种键具有某些双键的特性, 因而不能自由旋转。他们进一步推论, 肽基的 4 个原子和两个  $\alpha$  碳原子都位于单个平面上, 通过这种方式, 羰基的氧原子和—NH—基的氢原子相互呈现反式的关系 (图 6-3)。这种固定的平面排列结构是肽键的共振稳定作用的结果。

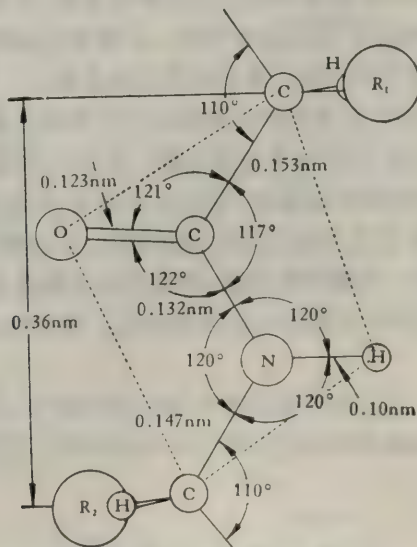


图 6-3 从 X 射线资料获得的肽键的大小。在虚线方框区的六个原子位于一个平面上。因为中央 C—N 键具有某些双键的特性, 这个平面有固定的趋势。键的长度以毫微米表示。[根据 T. P. Bennett, Graphic Biochemistry, Vol. 1. 重绘, 1968]

根据这些发现, 可以将一条多肽链的主链绘成一系列相对刚性的平面, 它们分别由取代了的亚甲基 (—CHR—) 隔开 (图 6-4)。在多肽链主链中, 全部正式单键的三分之一是



C—N 键,因为它们具有双键的特性而不能旋转。因此,肽键对一条多肽链可能具有的构象数目有明显的约束作用。以后我们将看到,由于主链上的C—C单键不总是可以自由旋转的,故一条多肽链的构象数目会受到进一步约束。

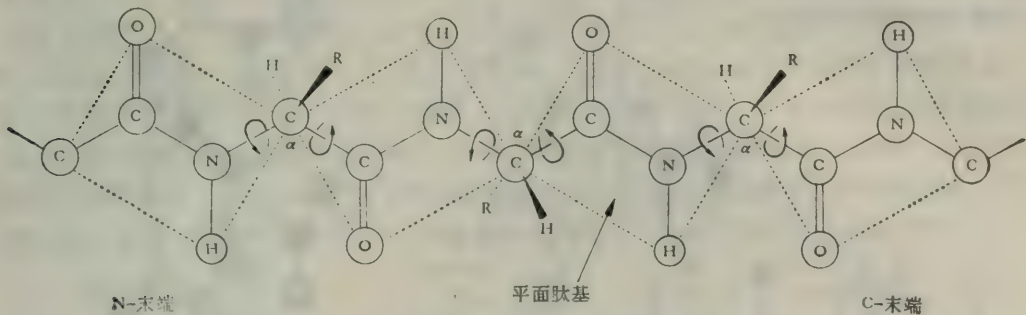


图 6-4 围绕多肽链的单键发生的有限旋转。仅仅连在 $\alpha$ -碳原子上的单键可以自由旋转,而平面肽基上的C—N单键是刚性的。

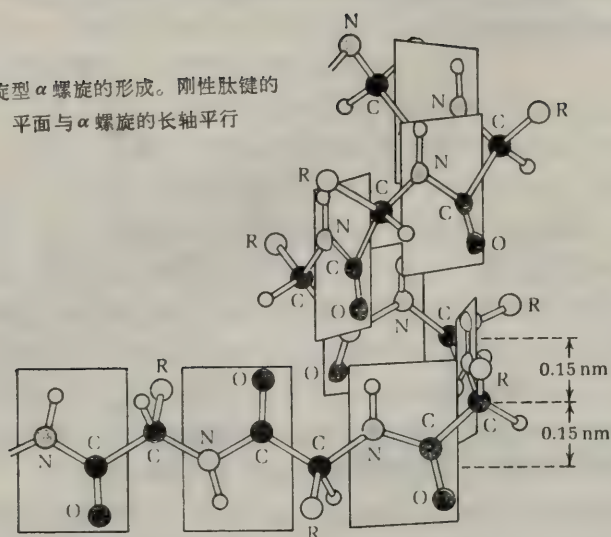
### $\alpha$ 螺旋和 $\alpha$ -角蛋白的结构

考虑到平面肽键强加的约束, Pauling 和 Corey 采用精确构造的模型,研究了多肽链的主链沿着一根轴盘旋或卷曲的所有可能方式,这样来解释在 $\alpha$ -角蛋白中所观察到的0.5—0.55 毫微米的重复单位。他们发现,最简单的排列是如图 6-5 所示的螺旋结构。在这种称为 $\alpha$ 螺旋的结构中,多肽链主链被排列成螺旋式卷曲,其每一圈大约含有 3.6 个氨基酸残基。这些氨基酸的 R 基团,由主链所形成的颇紧密的螺旋中向外伸出。在这样一种结构中,由单个一整圈螺旋组成的重复单位,沿着长轴伸出约 0.54 毫微米( $5.4 \text{ \AA}$ )。根据天然 $\alpha$ -角蛋白的 X 射线衍射图推算出来的 0.5—0.55 毫微米的大周期,与上列数值非常符合。而每一残基上升约 0.15 毫微米,这相当于在衍射图谱中也见到的 0.15 毫微米小周期。这样一种 $\alpha$ 螺旋结构,使螺旋的相邻两圈之间可以形成链内氢键,即平行于螺旋的长轴,在附于一个肽键的电负性氮上的氢原子与其上第三个氨基酸的羰基氧之间形成氢键(图 6-5)。这些氢键的电向量是定向排列成几乎产生最大的键力。但是最具有特殊意义的是,这种 $\alpha$ 螺旋排列使多肽链上每一个肽键都参与链内氢键的形成。虽然能形成多肽链的其他种螺旋卷曲,如 $\pi$ 螺旋(每一圈含 4.4 个氨基酸残基),但是它们既不能解释在蛋白质中 $\alpha$ -角蛋白类的重复单位的特定间隔,也不像 $\alpha$ 螺旋那样稳定。

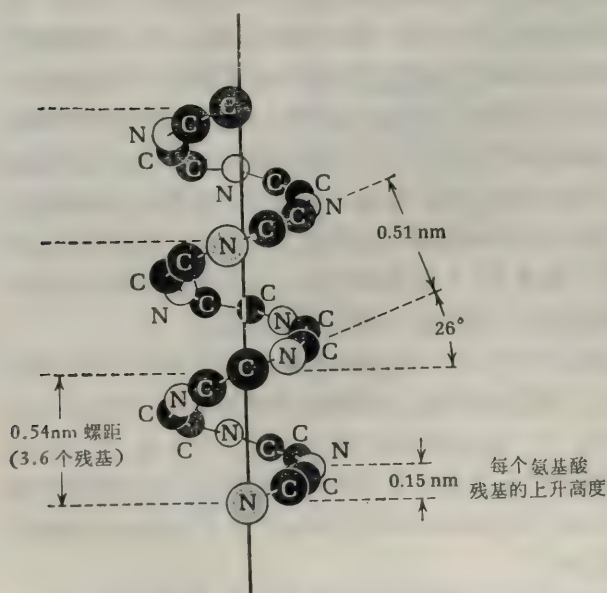
L-或 D-氨基酸均可形成 $\alpha$ 螺旋,但是一个含有 L 和 D 氨基酸残基混合物的多肽链却不能形成 $\alpha$ 螺旋。而且从天然存在的 L-氨基酸开始,可组成右手螺圈或左手螺圈;但右手螺旋的稳定性大得多。直到目前为止,所有被检定的天然蛋白质,都是右手 $\alpha$ 螺旋。Pauling 和 Corey 从这些结构考虑,提出了 $\alpha$ -角蛋白是由右手 $\alpha$ 螺圈形式的多肽链所组成。在毛发、羊毛的 $\alpha$ -角蛋白中,由 3 或 7 条这样的 $\alpha$ 螺旋互相扭缠,通过双硫交联键连接在一起,形成了三股或七股绳。(图 6-6)

现在让我们复习已在第三章中下过定义的一个名词。 $\alpha$ 螺旋代表 $\alpha$ -角蛋白的二级结构,亦即多肽链围绕和沿着它们的长轴作有规则的盘旋而形成的构象。

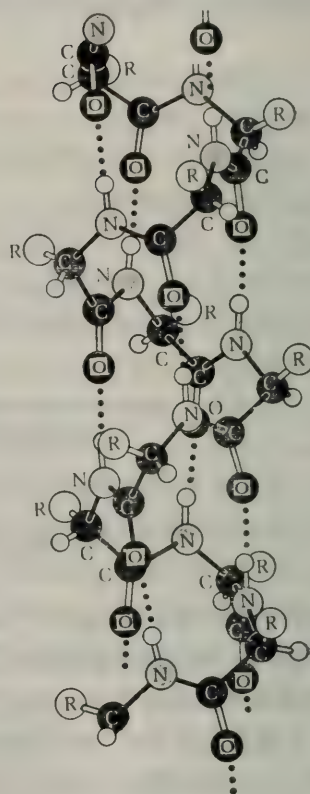
右旋型  $\alpha$  螺旋的形成。刚性肽键的平面与  $\alpha$  螺旋的长轴平行



一个  $\alpha$  螺旋的平均大小值螺距相当于  $5.4 \text{ \AA}$  的大周期性，而每一残基的上升高度相当于  $1.5 \text{ \AA}$  的小周期性。[引自 L. Pauling and R.B. Corey, Proc. Int. Wool Text. Res. Conf., B:249 (1955).]



$\alpha$  螺旋的球-棒模型显示链内的氢键(带○的圆点)



$\alpha$  螺旋的实体模型

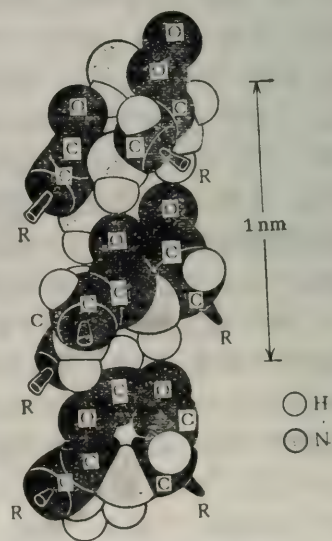


图 6-5  $\alpha$  螺旋。[上左和上右图以及下右图模型均引自 G. H. Haggis, D. Michie, A. R. Muir, K. B. Roberts and P.M.B. Walker, Introduction to Molecular Biology, 1964]



形成螺旋的和破坏螺旋稳定性的氨基酸

任何已知的多肽链究竟能在多大程度上以稳定的  $\alpha$  螺旋形式存在，这反映了多肽链的氨基酸组成和顺序。并非所有的多肽链都能形成稳定的  $\alpha$  螺旋(表 6-1)。有关这一点的最重要的知识，得自聚氨基酸的研究。聚氨基酸即所有氨基酸残基完全一致的多肽。聚丙氨酸的 R 基团小而且不带电荷，虽然它在 pH 7.0 的水溶液中能自发地形成  $\alpha$  螺旋，但是聚赖氨酸在 pH 7.0 时，并不形成  $\alpha$  螺旋，而是以无规形式存在。由于热运动，其柔韧的主链不停地在变化着。这是因为在 pH 7.0 时，聚赖氨酸的 R 基团都带有正电荷，它们如此强烈地互相排斥，以致克服了形成链内氢键的趋势。然而在 pH 12 时，由于赖氨酸的 R 基团不带有电荷，它们不相互排斥，故赖氨基酸在此 pH 能自发地形成  $\alpha$  螺旋(图 6-7)。



图 6-6 在毛发和羊毛的角蛋白中， $\alpha$  螺旋的超级卷曲模型。

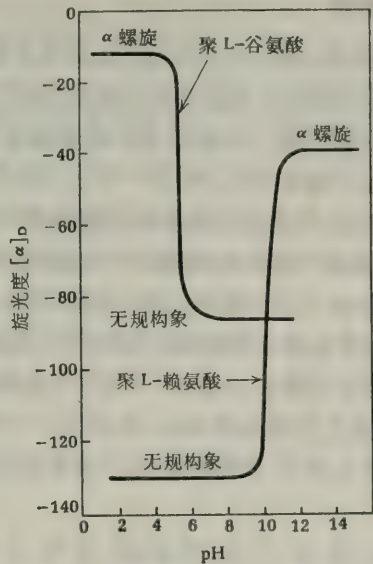


图 6-7 pH 值对聚-L-赖氨酸和聚-L-谷氨酸的无规构象与  $\alpha$  螺旋形式之间的转换的影响。 $\alpha$  螺旋的伸展伴有旋光性向较负值方面的明显改变。[重绘自 P. Doty in J. L. Oncley, (ed.) Biophysical Science, p. 108, 1959]

表 6-1 形成螺旋的和破坏螺旋稳定性的氨基酸

容许 $\alpha$ 螺旋稳定的	破坏 $\alpha$ 螺旋稳定性的
丙氨酸	丝氨酸
亮氨酸	异亮氨酸
苯丙氨酸	苏氨酸
酪氨酸	谷氨酸
色氨酸	天冬氨酸
半胱氨酸	赖氨酸
蛋氨酸	精氨酸
组氨酸	甘氨酸
天冬酰胺	中断 $\alpha$ 螺旋的
谷氨酰胺	脯氨酸
缬氨酸	羟脯氨酸

在 pH 7.0 时,聚谷氨酸同样也是一种无规结构,因为在此 pH 它的 R 基团都带有负电荷。但是在 pH 2.0 时,它的 R 基团都被质子化而形成  $\alpha$  螺旋。(图 6-7)

不仅电荷相互作用的存在,而且多肽链侧链的大小或体积,都决定了任何已知的多肽链能否形成  $\alpha$  螺旋。聚异亮氨酸不能形成  $\alpha$  螺旋,这是由于邻近其  $\alpha$ -碳原子的庞大 R 基团产生了位阻。聚脯氨酸的  $\alpha$ -氮原子是刚性 R 基环的组成部分,环上的 N—C 键既不能转动,肽链的 C—N 键亦不能转动。而且聚脯氨酸不能形成链内氢键。只要有脯氨酸(或羟脯氨酸)在一条多肽链中出现,它就能阻断  $\alpha$  螺旋而产生刚性纽结或弯曲。虽然聚甘氨酸能形成  $\alpha$  螺旋,但它是另一类型的主链构象为主,即肽链较为伸展的  $\beta$  构象。由于对不同的合成聚氨基酸开展了模型研究,可以就各类氨基酸形成  $\alpha$  螺旋盘绕的能力将它们分类。(表 6-1)

### $\alpha$ 螺旋的光学性质

L-氨基酸残基的每一个不对称  $\alpha$ -碳原子都表现出各自的旋光度,与这些旋光度的总和比较,天然蛋白质的旋光度明显地更趋右旋。这种额外的右旋能力以  $\alpha$  螺旋形式最大;而呈无规线圈的多肽链,其旋光力则仅表现为简单的相加。例如,聚 L-谷氨酸的旋光率在 \* pH 2 时(呈  $\alpha$  螺旋形式)约为  $-15^\circ$ ,而在 pH 7 时(呈无规形式)则约为  $-85^\circ$ (图 6-7)。几乎所有的球状蛋白在变性时都更趋向左旋。

含有一个或多个不对称碳原子的化合物,具有使平面偏振光的平面发生旋转的能力,但是其他形式的分子不对称性,即令在不合不对称碳原子时,也可显示光学活性。其基本原则在于,该分子能否存有两种不同的不可重叠的镜像形式。在 L-氨基酸构成的  $\alpha$  螺旋中,这种分子的不对称性总值,等于其不对称碳原子和  $\alpha$  螺旋所导致的不对称的总和。 $\alpha$  螺旋能以右手或左手的构型存在,故具有不对称性。我们可以利用变性(即转变为无规形式)前后的旋光力变化,来观测任何已知多肽链中  $\alpha$  螺旋的大致数量。

### 多肽链的可允许性和不可允许性构象: Ramachandran 图

我们已经知道,在多肽链主链中每个第三位键都具有某些双键的性质,不能自由旋转。另外,我们也知道某些氨基酸(如异亮氨酸或赖氨酸)的侧链(在 pH 7.0),对形成稳定的  $\alpha$  螺旋是不利的。这些观察的结果使我们试图从掌握一条已知多肽链的氨基酸顺序开始,来更加定量地预测该多肽链的主链构象。Ramachandran 及其共同工作者阐明了一系列非常有用的关系。图 6-8 表示具有两个平面肽键的三肽的主链。每一肽基的 C—N 主链键都具有某些双键的特性,并且不能旋转。现将主链上的其他键标志为  $C_\alpha$ —N 和  $C_\alpha$ —C。由于它们是真正的单键,故在理论上能自由旋转。但是,如连接到中央  $\alpha$ -碳原子上的 R 基团相当大的话,它就会阻止环绕  $C_\alpha$ —N 和  $C_\alpha$ —C 键发生充分的旋转。而且如这些键的旋转彼此相关,则会发现当旋到某一角度时,肽键上两个 H 原子(或氧原子)将会互相重叠而有碍其自由旋转。因此,每一对相邻的肽键对  $C_\alpha$ —C 和  $C_\alpha$ —N 单键的旋转自由度可施加两种约束力。

\* 此处原文有重复印刷的错误。——译者注



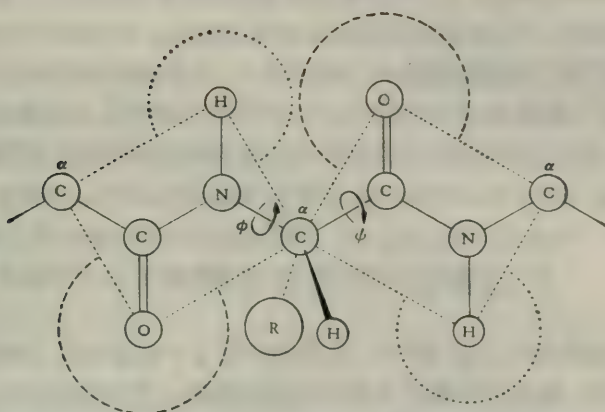


图 6-8 球-棒模型,显示两个相邻肽基之间的 $\phi$ 和 $\psi$ 角。带有右旋氨基酸残基的R基团的 $\alpha$ -碳原子,可将肽基平面分开。在此图解中,肽基的平面即在此书页的平面中;这是一种伸展型或开放型的肽键。如将 $\alpha$ -碳原子和右旋平面固定,而R基位于书页的平面之下,使左旋平面从箭头所示方向的位置旋转,此时所对的角度是 $\phi$ 角。如将左旋平面固定于 $\phi = 0^\circ$ ,当右旋平面按所示方向旋转时,所对的角度则为 $\psi$ 角。两者都可以独立旋转。当 $\phi$ 角接近 $180^\circ$ 而 $\psi$ 角为 $0^\circ$ 时,则碳基上氧原子(破折虚线轮廓)将出现重叠,并阻止其进一步旋转。因此,当 $\phi$ 为 $0^\circ$ ,而 $\psi$ 接近 $180^\circ$ 时,则连在肽基氮上的氢原子(点虚线轮廓)会重叠在一起。

$C_\alpha-N$  键的旋转角度叫 $\phi$ 角,而 $C_\alpha-C$ 的键旋转角叫 $\psi$ 角(图 6-8)。根据理论探索或精密的肽键模型进行估计, Ramachandran 绘制了一种图解,表明由相邻的  $C_\alpha-C$  和  $C_\alpha-N$  单键可允许和不允许形成的 $\phi$ 角和 $\psi$ 角(图 6-9)。 $C_\alpha-C$  和  $C_\alpha-N$  单键的可能稳定的构象在数量上是颇有限的,只有位于图 6-9 中较小区内(左下 1)的构象被容许存在;其它所有构象都由于空间原因而不可能存在。

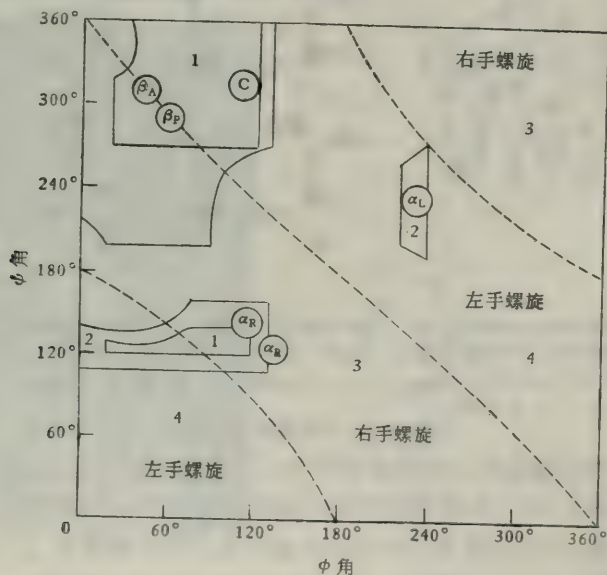
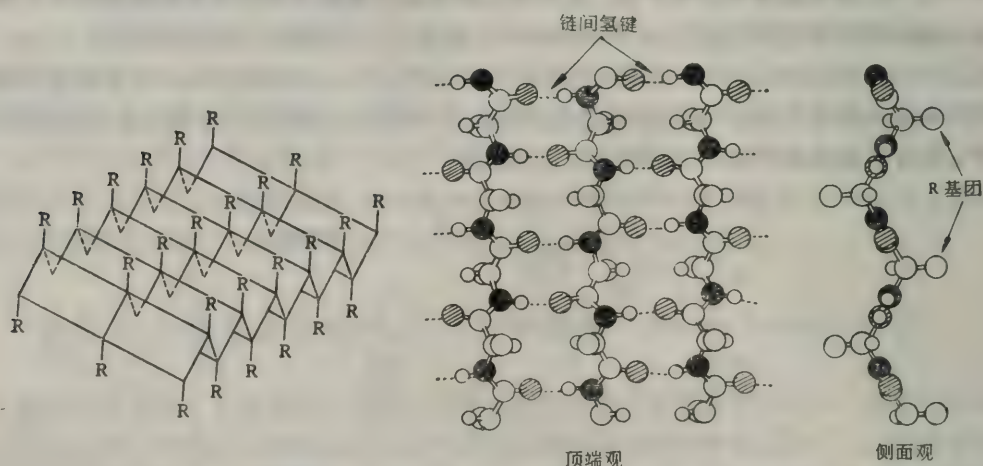


图 6-9  $\phi$ 角对 $\psi$ 角的 Ramachandran 图解。1 区代表稳定的许可性构象的 $\phi$ 角和 $\psi$ 角;2 区代表稳定性较差的构象。图中所有其它面积则相当于不允许存在的 $\phi$ 角和 $\psi$ 角。嵌入 3 区内的 1, 2 面积属于右手 $\alpha$ 螺旋,而嵌入 4 区内的属于左手 $\alpha$ 螺旋。 $\alpha_R$  = 右手 $\alpha$ 螺旋; $\alpha_L$  = 左手 $\alpha$ 螺旋; $C$  = 胶原螺旋; $\beta_A$  = 反平行的 $\beta$ 折叠; $\beta_P$  = 平行的 $\beta$ 折叠。

例如,在 Ramachandran 图解中, $\alpha$  螺旋是一种可许性构象。因为在一条  $\alpha$  螺旋多肽链中,全部相邻的肽键都对位于允许的区域。对  $\alpha$  螺旋而言,最稳定的角度是  $\phi = 132^\circ$  和  $\psi = 123^\circ$ 。然而我们应当注意,假如  $\phi$  角明显增大,而  $\psi$  角不改变,即偏离了可许性区域:或者若  $\psi$  角明显增大或减小,而  $\phi$  角不改变,则同样也偏离了可许性结构的范围。因此,对任一对已知的  $\phi$  和  $\psi$  角,我们能够预测这种构象是否容许存在。所有本来存在于天然蛋白质主链中的构象,都在 Ramachandran 图解所允许的区带内。(图 6-9)

## $\beta$ -角蛋白: $\beta$ 构象与褶皱片

我们知道,从  $\alpha$ -角蛋白的 X 射线研究,使我们获得了  $\alpha$  螺旋的现代知识。同样,有关  $\beta$  角蛋白的 X 射线研究,揭示了多肽链  $\beta$  构象的重要线索。我们可以回忆,当  $\alpha$ -角蛋白的纤维经受湿热处理后,它们能被伸展到几乎为原有长度的一倍。在这种伸展条件下,它们的 X 射线衍射图谱与丝的丝心蛋白 ( $\beta$ -角蛋白的一例)相似。Pauling 和 Corey 作出结论,当毛发或羊毛经蒸汽处理,可使  $\alpha$ -角蛋白转变为  $\beta$ -角蛋白结构。这是由于通常稳定  $\alpha$  螺旋的链内氢键发生热裂,继而较紧凑的  $\alpha$  螺旋被牵拉成更为伸展的锯齿状多肽链构象,这是  $\beta$ -角蛋白通常所特有的构象,他们称之为  $\beta$  构象。在此构象中,并列着的多肽链通过链间氢键的交联,排成褶皱片式构象 (图 6-10)。所有的肽键都参加了这种交联,



这是三条平行  $\beta$  结构的图解,表示它们的褶皱排列。全部 R 基团伸出于书页的平面之上或之下。[重绘自 T.P. Bennett, *Graphic Biochemistry*, Vol 1, 1968]

球-棒模型。注意在各链之间最多的氢键结合,以形成一个反向平行排列的褶皱片构象。(重绘自 H. D. Springall, *The Structural Chemistry of Proteins*, p. 64, 1954)

图 6-10 多肽链的  $\beta$  构型

因此给结构带来很大的稳定性;而 R 基团则位于褶皱片的锯齿面上方或下方。这类型的二级结构见于 *Bombyx mori* 种蚕分泌的丝心蛋白。在绝大多数类型的丝心蛋白中,每隔一个氨基酸是甘氨酸,所以在褶皱片一边的全部 R 基团都是氢原子,因为丝心蛋白的其余氨基酸主要是丙氨酸,故分布在褶皱片另一侧的大多数 R 基团是甲基。丝心蛋白和  $\beta$ -角蛋白都富含带有较小 R 基团的氨基酸,特别是甘氨酸和丙氨酸。假如 R 基团很大或具有相同的电,由于荷 R 基团的相互作用将使褶皱片构象不能存在。这就是为什么伸展型  $\alpha$  角蛋白常不稳定,且能自发地回复到  $\alpha$  螺旋形式的原因。 $\alpha$ -角蛋白的 R 基团较丝的丝心蛋



白者为大,且其上所带电荷也远较后者的 R 基团为多。(见表 5-2)

在  $\alpha$ -角蛋白与天然  $\beta$ -角蛋白之间,尚有其他两点不同。在  $\alpha$  型,所有的多肽链是平行的,即沿着 N-端到 C-端的同一方向排列;而丝心蛋白的相邻多肽链却是反向平行的,即朝相反的方向伸展。另外,  $\alpha$ -角蛋白中含有许多胱氨酸残基,它们的排列为相邻的多肽链之间提供了链间的—S—S—交联键。反之,  $\beta$ -角蛋白(如丝心蛋白)没有—S—S—交联键。

如我们回顾 Ramachandran 图解(图 6-9),我们就会注意到,平行的和反向平行的褶叠片构象两者肽键的  $\phi$  和  $\psi$  角都在可许性结构的范围内。

## 胶 原

高等动物中另一主要类型的纤维状蛋白是结缔组织的胶原。它是高等脊椎动物的所有蛋白质中最丰富的一种,构成机体蛋白质总量的三分之一或更多。动物越大越重,胶原在其总蛋白质中所占的比例就越大。例如,已经适当地讲到,主要由皮革、腱、骨和其他结缔组织中的胶原原纤维将母牛连成一个整体。胶原原纤维视特殊结缔组织的生物学功能不同而排列成不同的方式。在肌腱胶原,纤维以平行束排列,这样就产生了高强度的结构,但是很少或不具有牵张能力。而在母牛的皮革内,胶原原纤维形成交织的网,以叠片形式存在。眼角膜的有机物几乎是纯的胶原。在结缔组织中,胶原原纤维无论怎样进行排列,在电子显微镜下(图 6-11)原纤维总呈现特殊的横纹外貌。根据胶原的类型和生物的种属不同,其重复距离在 60—70 毫微米之间。在水中煮沸时,胶原变成一个混合的多肽——明胶。

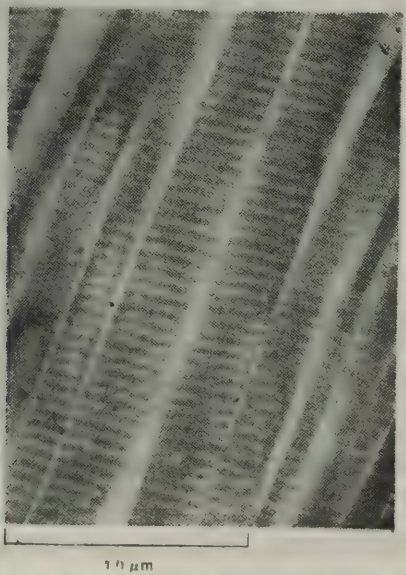
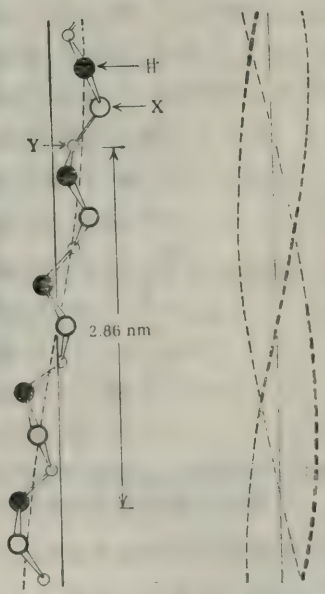


图 6-11 结缔组织的胶原原纤维的电子显微照片。注意交叉横纹的周期性,其重复距离为 70 毫微米。



原胶原的单条多肽链      三股原胶原分子  
(280 × 1.4 毫微米)

图 6-12 在三股原胶原分子中多肽链的构象。每条链是由许多个甘-X-Y 的重复顺序组成的螺旋。

虽然不同种属的胶原在氨基酸顺序方面有些差异,但是绝大多数胶原含有约 35% 的甘氨酸和 11% 的丙氨酸,这点同  $\beta$ -角蛋白相似。胶原的特色是含有大约 12% 的脯氨酸和 9% 的羟脯氨酸,而后一种氨基酸除了胶原外很少在其他蛋白质中发现。

胶原也具有特殊的 X 射线衍射图谱,它不同于  $\alpha$  和  $\beta$ -角蛋白。比较胶原和聚脯氨酸的 X 射线图谱,可以推论胶原的二级结构为多肽链的三股螺旋所组成(图 6-12)。每一条链是左手三残基螺旋;通过氢键将各链连接在一起。含量高的脯氨酸残基决定了这种多肽链螺旋排列的特殊类型;而每隔第三位出现的甘氨酸的较小 R 基团,则使这些链缠绕在一起。虽然胶原链的完全氨基酸顺序尚不清楚,但是-甘-X-脯,-甘-脯-X,和-甘-X-羟脯等顺序经常出现,此处 X 可能是任一种氨基酸。除胶原以外,似乎没有其他的蛋白质含有同样的三股螺旋链。

胶原是由重复出现的亚基结构——带有特殊“头部”的三股原胶原分子所组成。这些亚基从头到尾排成许多平行束,但是头部是交错的(图 6-13)。因此,这点说明了在不同种属的胶原原纤维中其重复单位所特有的 60—70 毫微米间隔。原胶原的多肽链借助于脱氢赖氨酸缩正亮氨酸残基进行共价交联(图 6-13),而此残基是通过由相邻原胶原亚基上二个赖氨酸残基之间的酶促反应形成的。

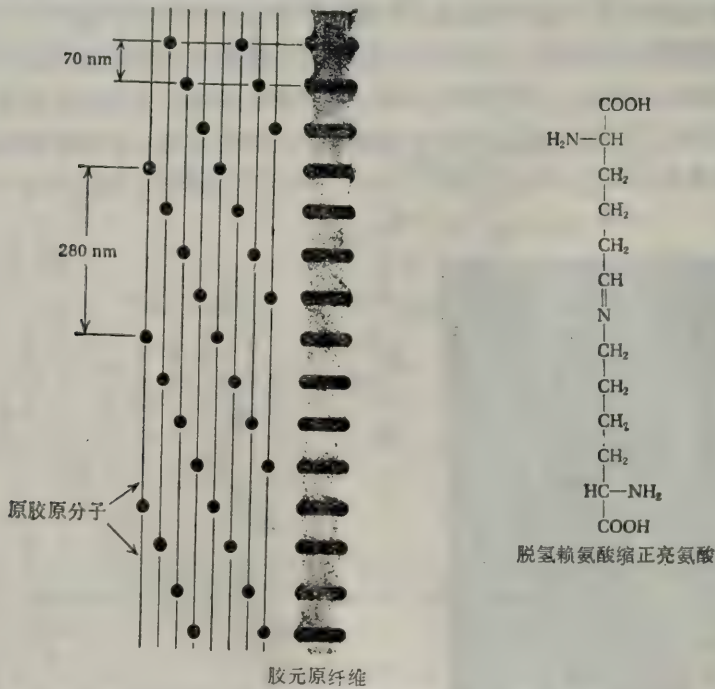


图 6-13 带有头部的原胶原分子的交错排列,造成水化胶原纤维中 70 毫微米长的重复单位。右图为脱氢赖氨酸缩正亮氨酸的结构,它在平行的胶原链之间形成一种共价的交联键。

关于其他纤维状蛋白的多肽链二级结构,现在尚不清楚。目前正在研究韧带的弹性结缔组织含有的弹性蛋白和壳硬蛋白,后者是昆虫的轻韧性外壳的结构蛋白质。弹性蛋白特别有趣,因为它的多肽链借助共价连接,形成了一种可牵张的双向层片,类似杂技蹦床网。这种多肽链是通过接到锁链赖氨酸和异锁链赖氨酸残基上的共价键而连接起来的。另一个很有兴趣的结构蛋白质是节肢弹性蛋白,它存在于某些昆虫的翅膀关节处,因



具有完全可逆性收缩的性质而引人注目。

## 球状蛋白的三级结构

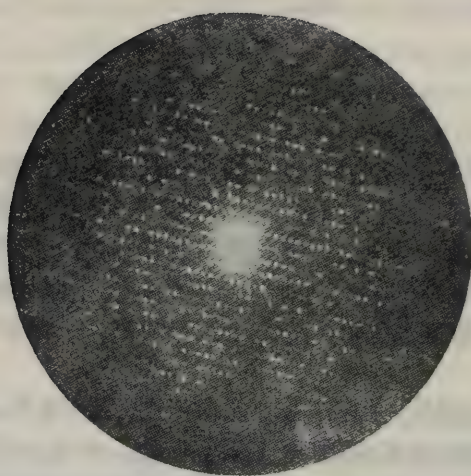
现在我们由结构比较简单的纤维状蛋白转到更复杂的球状蛋白。它们的多肽链紧密褶皱成稠密的立体结构,从而表现出许多不同类别的特殊生物学活性。直到晶体球状蛋白的X射线分析能够实现以前,对它们的多肽链究竟如何褶皱成立体构象几乎一无所知。事实上,根据其他的物理学方法,粘度、沉降和扩散的测定等,仅能推测有关球状蛋白形状的最原始的轮廓,因为这些方法仅能算出蛋白质分子的轴率,但对于它们的内部结构不能提供任何情报。

解释球状蛋白的X射线衍射图谱,远较纤维状蛋白困难得多,因为其多肽链并非沿着一根轴排列,而是不规则和紧密地褶皱成近球形构象。然而如将强烈衍射和电子云稠密的重金属原子引进球状蛋白分子,即能为衍射图谱的数学解释提供参比点,从而使许多球状蛋白立体结构的观测达到0.6毫微米的分辨率,在某些情况还可达到0.2毫微米。在球状蛋白中,其三级结构现已完全清楚的计有肌红蛋白、血红蛋白、溶菌酶、核糖核酸酶、糜蛋白酶、羧肽酶A、细胞色素c、乳酸脱氢酶和枯草杆菌蛋白酶(从细菌获得的一种蛋白水解酶)等。虽然只有少数蛋白质的构象被详细了解,但是有关结果已经产生了对许多球状蛋白可能适用的一些重要概念。

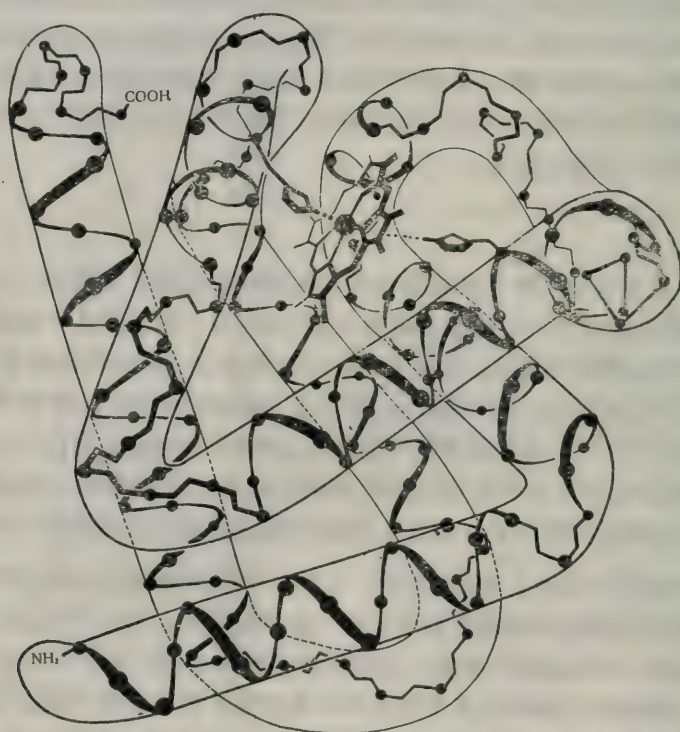
### 肌红蛋白

Kendrew 及其共同工作者在英国对抹香鲸肌红蛋白的X射线研究是在这方面的第一项重要突破。肌红蛋白是一种比较小的球状蛋白,含有一条由153个氨基酸残基组成的多肽链,其氨基酸顺序现已阐明。它含有一个与血红蛋白一样的铁卟啉基或血红素基;肌红蛋白也能执行可逆的氧合与脱氧作用。事实上,在功能和结构上,它属于血红蛋白族化合物,而血红蛋白含有四条多肽链和四个血红素,其分子量比肌红蛋白大四倍。肌红蛋白存在于骨骼肌细胞内,在潜水哺乳动物如鲸、海豹和海象中特别丰富。这些动物的肌肉如此富含肌红蛋白,以致呈深褐色。肌红蛋白不仅能贮氧,并且也能加速氧透过细胞的扩散速度。

晶体肌红蛋白含有约2,500个原子,它的X射线衍射图谱由将近25,000个反射点所组成。肌红蛋白结构的X射线分析是分两个阶段发展的。1957年完成了第一阶段,所得结果的计算达到0.6毫微米分辨率。这项工作需要精确地分析400个衍射点(图6-14)。这种程度的分辨率还不够揭示各个原子的正确位置,但是它能表明在肌红蛋白分子中多肽链的主链是如何折叠的。在第二阶段,肌红蛋白的X射线分析达到了0.2毫微米的分辨率。这需要分析大约10,000个反射点,采用高速度电子计算方法,这种分辨水平是相当高的,它能鉴定绝大多数R基团的顺序,与用化学方法测定的氨基酸顺序相符。肌红蛋白分子的主链,由八个比较直的段节组成,彼此在弯折处隔开(图6-14)。每一直的段节都是一截 $\alpha$ 螺旋,最长的含有23个氨基酸,而最短的仅含有7个氨基酸;全部都是右手螺旋。其分子中约有70%氨基酸分布在这些直的 $\alpha$ 螺旋区;此数据证实了肌红蛋白溶液的旋光测定结果。虽然肌红蛋白的立体结构看来是不规则和不对称的,但并非完全无规。所有的肌红蛋白分子都具有相同的构象,否则肌红蛋白就不能结晶和产生可重现的X射



抹香鲸肌红蛋白的X射线衍射图谱[引自 J. C. Kendrew, *Scientific American*, December 1961]



按照高分辨率(0.2毫微米)的X射线分析资料推导出的肌红蛋白的主链结构。[重绘自 R. E. Dickerson, in H. Neurath, (ed.), *The Proteins*, P. 64, 1964]

图 6-14 肌红蛋白的结构

线衍射图谱。

肌红蛋白结构的一些其他的重要特征是:

- (1) 它的分子排列非常紧密,其内部留有的空间仅能容纳 4 分子水。
- (2) 氨基酸残基的全部极性 R 基团都位于分子的外部表面,并且呈水化状态。
- (3) 几乎全部非极性或疏水性 R 基团都位于分子的内部,因此可避免与水接触。



(4) 脯氨酸残基仅出现在链的弯折处。在这里也含有某些已知不易形成  $\alpha$  螺旋的氨基酸,如异亮氨酸和丝氨酸。

(5) 对已被检查的不同种属的肌红蛋白而言,虽然它们的氨基酸组成稍有差别,而其多肽链的总构象显然是一致。因此,在氨基酸顺序中保留或不变的残基,与决定弯折的位置和直的段节的走向有关。

### 其它球状蛋白质的结构

对许多其它球状蛋白的结构所作 X 射线分析表明,每一类型的蛋白质都具有特定的折叠模式或三级结构。迄今已检查过的所有球状蛋白,和肌红蛋白一样也表现出三个共同的特点:(1) 紧密折叠,其内部容纳水分子的空间很小或缺如;(2) 几乎所有的亲水 R 基团都位于分子外面;(3) 几乎所有的疏水 R 基团都位于分子内部。虽然超过 70% 的肌红蛋白多肽链以  $\alpha$  螺旋节段的形式存在,但这种高的比率是不寻常的。目前已检查过的绝大多数球状蛋白只含有很少量的  $\alpha$  螺旋。某些球状蛋白则含有肌红蛋白所没有的  $\beta$  构象段节。

我们可以略述少数其它球状蛋白的各结构特点。溶菌酶是从蛋清中分离出来的一种酶,能催化复杂多糖中一些糖苷键的水解,而这些多糖则存于某些细菌的细胞壁内。它的单链含有 129 个氨基酸残基,它还含有 4 个链内胱氨酸交联键。溶菌酶的氨基酸残基仅有约 25% 呈  $\alpha$ -螺旋区形式。另一方面,溶菌酶与肌红蛋白的相似处则在两者都属于紧密折叠的结构,而且几乎所有的极性 R 基团都分布在分子的外面,几乎所有的疏水性 R 基团都位于分子内部。溶菌酶的表面有一个大裂缝,已证明这是与底物分子契合的该酶活性部位。这裂缝的外沿围绕着  $\alpha$  螺旋。溶菌酶的立体结构在其催化活性中所起的作用将在第九章中讨论。

对细胞色素 c 也已经进行了高分辨率的研究(图 6-15)。虽然它是一个血红素蛋白质,但它的结构与肌红蛋白很少相似或完全不同。细胞色素 c 分子含有少数  $\alpha$  螺旋段节和多肽链呈伸展构象的许多区域。这种伸展的段节被包裹着,充填在血红素基的周围,而后者又几乎被埋藏在一条裂缝之中。这种结构使血红素基团具有疏水环境,而其朝外界介质的那一边则除外。

核糖核酸酶也有一个长而浅的裂缝,它似乎就是能与长底物分子契合的活性部位。核糖核酸酶也含有比较少的  $\alpha$ -螺旋,但是含有相当量的  $\beta$  结构。X 射线分析表明,糜蛋白酶是一个粗略的球状分子,其主链的许多平行线圈呈  $\beta$  构象;在其 241 个氨基酸残基中,仅约有 18 个组成  $\alpha$ -螺旋段节。

已经用 X 射线方法测定了结构的绝大多数球状蛋白都是酶。在分析某些具有其他生物学功能的代表性蛋白质以前,想对球状蛋白的三级结构作进一步概括尚为时过早。但是我们要问:用晶状蛋白质进行 X 射线衍射分析所揭示的一种蛋白质分子的立体结构,是否就是它在水溶液中结构的精确图案,而这种蛋白质又必须在水溶液中完成其生物学作用。

在回答此问题所采取的一个途径中,Richards 及其共同工作者发现,当通过共价交联使核糖核酸酶晶体的各个分子进入晶格时,就能阻止它们溶解于溶液中,但它们仍可保留催化活性,这表明结晶并不能使该分子明显扭曲成失活的构象。同样,已经发现结晶状态

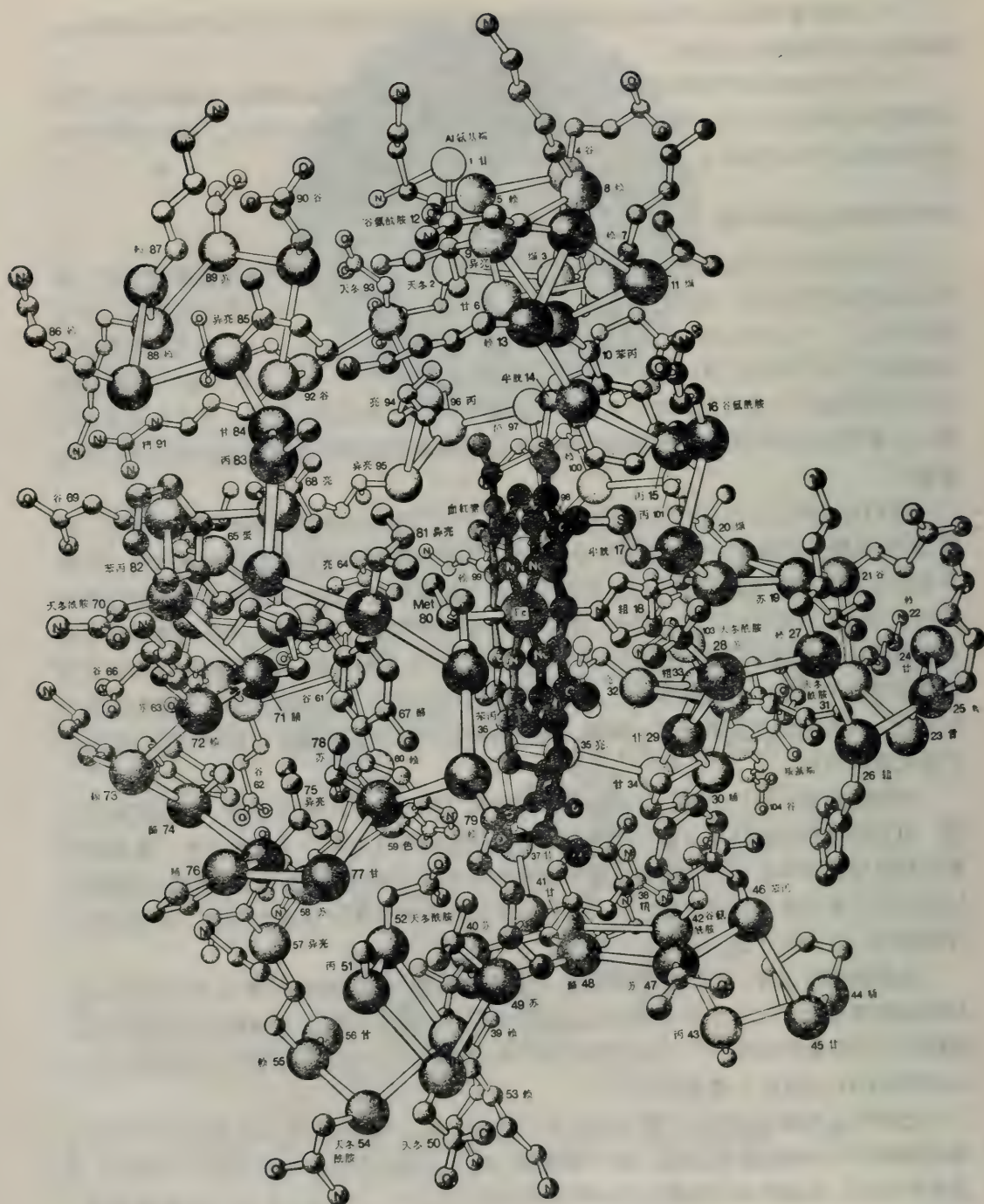


图 6-15 细胞色素 c 的多肽链主链的构象，中央的黑球表示其血红素部分。[I. Geis 绘自 Dickerson, R. E., "The Structure and History of an Ancient Protein," *Scientific American*, April 1972.]

的糜蛋白酶和羧肽酶也具有催化活性。这途径和其他途径似乎表明，球状蛋白在溶液中的总构象和晶态中的一样，但是其他实验证据却清楚表明，当某些蛋白质，特别是酶，在水溶液中发挥其正常功能时，会表现一定量的柔性。因此，蛋白质分子在溶液中并不完全是



刚性的,而是可以像“呼吸”那样有所伸缩。

## 球状蛋白的氨基酸顺序对其三级结构的规定作用

在加热,以酸或碱处理,或暴露于尿素或盐酸胍的浓溶液中时,天然的球状蛋白会发生变性,引起它们的多肽链变成伸展的无规构象。虽然这种变化伴有其生物活性的丧失,但是有些变性的蛋白质却能自发地恢复其生物活性及原来的天然构象,有时这个过程还进行得非常快。White 和 Anfinsen 以及他们的共同工作者用核糖核酸酶完成的经典实验,首次证明了氨基酸顺序在决定天然构象上的重要作用。在有还原剂  $\beta$ -巯基乙醇存在下,以  $8\text{ M}$  尿素处理天然的核糖核酸酶,可使该酶分子完全展开,产生一种无规则形式(图 6-16)。在这个过程中,由核糖核酸酶的胱氨酸残基所组成的四个链内双硫桥被  $\beta$ -巯基乙醇裂解,变为 8 个半胱氨酸残基。这种展开与交联键裂解的结合反应,将导致酶活性的完全丧失,但是当通过透析从核糖核酸酶溶液中慢慢移除尿素和  $\beta$ -巯基乙醇时,该酶活性又可逐步恢复。这表明甚至在完全伸展后,核糖核酸酶的多肽链仍然含有促使其自发地折叠以回复到具有催化活性的三级结构所必需的信息。在此过程中,8 个半胱氨酸的残基被空气中氧重新氧化,重建为 4 个双硫交联桥。特别有意义的是,这四个胱氨酸交联桥属于“正确的”交联桥,包含了如天然酶分子一样的半胱氨酸残基对。概率的计算表明,在随机的基础上,8 个半胱氨酸残基于单条多肽链中能形成 105 组 4 个不同的双硫键配对。然而现在只形成了天然核糖核酸酶分子中唯一含有的那组双硫键,从而表明核糖核酸酶的氨基酸顺序能精确和准确地决定天然酶分子中多肽链的空间排列,也能决定适当的一SH 基经由严格契合以生成正确的双硫交联键的过程。

某些缺乏双硫交联键的蛋白质,在变性后也能自发而迅速地重新折叠成天然的活性构象。Anfinsen 及其共同工作者已经证实,当酸化至  $\text{pH } 3.0$  时,从葡萄球菌细胞分离出来的核酸酶将丧失它的全部生物活性和天然构象;而当  $\text{pH}$  恢复到 7 时,它又很快重新获得活性。根据这些和许多有关其他球状蛋白再天然化的同样实验,现在已经十分明确,氨基酸的顺序规定了球状蛋白特殊的三级结构,而后者又反映了对围绕多肽链的单键进行旋转的自由度的各种约束力。概言之,这些约束力包括肽键的刚性平面的本质,连续残基的  $\text{C}_\alpha-\text{C}$  和  $\text{C}_\alpha-\text{N}$  键的可允许性  $\phi$  角和  $\psi$  角,在氨基酸顺序中疏水残基和亲水残基的数

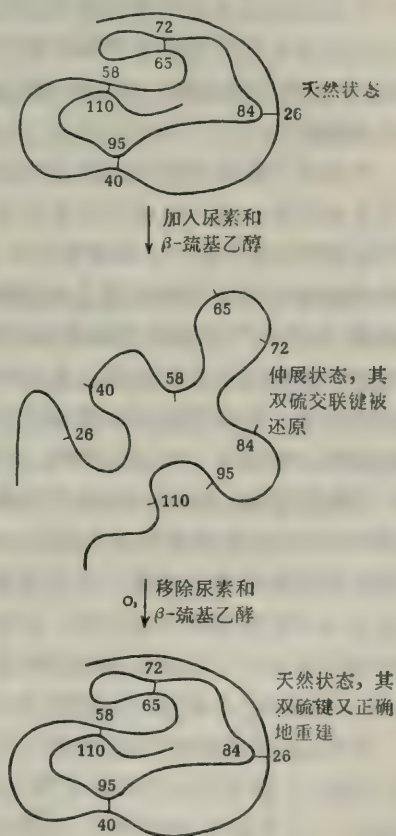


图 6-16 伸展的还原型核糖核酸酶的再天然化,重建了正确的双硫交联键。

目和位置,以及带正电荷与负电荷的R基团的数量和位置等。因此,多肽链的构象是其主链中每一单键针对不同的局部和大范围约束力发生调整的结果,从而产生了具有特异生物活性的唯一的特定三级构象。

### 球状蛋白的三级结构的稳定作用

球状蛋白的天然三级结构一旦形成,就有四种主要类型的弱相互作用力或键协同起稳定作用:(1)肽基间的氢键,如见于 $\alpha$ 螺旋或 $\beta$ 褶叠;(2)R基团之间的氢键;(3)非极性R基团之间的疏水性相互作用力;及(4)在带正负电荷基团之间的离子键,如天冬氨酸或谷氨酸的R基团的一 $\text{COO}^-$ 与赖氨酸R基团的一 $\text{NH}_3^+$ 之间的。研究这四类弱键中每一种对天然蛋白质分子的总构象稳定性的相对作用,使我们现已清楚,非极性R基团之间的疏水性相互作用力是最重要的。绝大多数蛋白质含有30—50%的带非极性R基团的氨基酸;X射线分析表明,几乎所有这些R基团都分布在天然球状蛋白的内部,因此可避免与水接触。

为充分了解疏水性相互作用力在稳定蛋白质结构中的重要意义,我们首先必须提出一个基本问题:为什么变性的呈无规线圈状的多肽链趋向于自发地折叠成有高度规律和生物活性的构象(这一过程显然降低了多肽链的熵)?热力学的第二定律叙述,所有的过程都是朝着获得最大熵值或无规性的方向进行。蛋白质折叠是不是违反了这条定律?我们发现,解决这个困境的答案存在于力量的平衡之中,一种力量是多肽链寻求其本身的最大无规性或熵值构象的趋势。对抗的力量则是它周围的水分子寻求其最大无规性或熵值位置的趋势。而非极性的R基团代表了在这种力量平衡中的临界因素。当非极性基团进入水中时,产生了一个新的界面。它需要邻近的水分子具有较之在纯水液更加规则的排列;因此需要输入能量以迫使非极性R基团进入水中。非极性R基团处于暴露状态的不规则的多肽链,将可能表现为这样一种构象,即它的非极性R基团被保护起来,避免与水接触。周围的水分子松弛而呈现其最大熵值状态的倾向,会引起多肽链从无规伸展的状态转变为高度规则的三级构象。在平衡条件下,当不规则的多肽链充分折叠时,周围水分子熵值的增加大于现在正确盘绕的多肽链所减少的熵值,这并没有违反热力学的第二定律,因为此系统(多肽链)和周围(水分子)的结合发生了熵值净增的变化。

然而,许多证据提示,折叠的天然构象仅仅在较小的程度上比伸展或变性的构象稳定些。因此,天然球状蛋白的稳定性,是在两种比较巨大的对抗力量之间进行微弱平衡的结果,即:(1)多肽链伸展成较为无规排列的趋势,以及(2)其周围水分子寻求达到它们的最无规状态的趋势。

在这节讨论中我们已经假定,球状蛋白的天然构象是比较稳定的,即在生物学条件下,它们所含的自由能较无规线圈形式为少。但是这种假设并非对所有的蛋白质都正确,它还是一个争论很多和需要研究的课题。在pH、离子强度和温度的特定条件下,那些自发地重新折叠成为它们的天然形式的蛋白质,可能确实较其变性形式稳定(图6-17)。在另一方面,某些蛋白质的伸展形式又可能含有较其天然形式为少的自由能。在这样的情况,从天然形式到无规状态的转变可能具有一个非常高的活化能阈,因此能使多肽链保持其天然构象。在此情况下,天然形式一旦伸展,多肽链将不能自发地重新折叠为其天然构象。



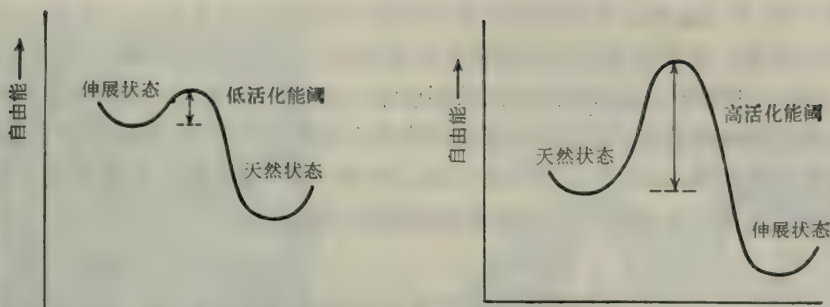


图 6-17 天然和伸展(变性)的多肽链的相对自由能。左图——一种蛋白质,其天然构象所含的能量较伸展形式为低:如活化能阈甚低,已伸展的多肽链将非常迅速而自发地重新折叠。右图——另一种蛋白质,其变性形式所含的能量较天然形式为低。在这一情况,其天然形式在生物学条件下是稳定的,因为伸展需要很高的活化能阈,它只有通过加热或其他作用才能克服。

这些考虑有很大的生物学意义。当活细胞用其组成的氨基酸以合成蛋白质时,它们是从 N 末端开始,一个残基接着一个残基构成的。然而,新形成的多肽链究竟如何折叠成其特异的生物活性构象,有关这一过程的机制和特性,我们了解得很少。

### 蛋白质折叠的动力学

多肽链折叠成其天然构象的一个特别重要的方面,是它在生物学上必然以极高速率出现。如我们假定一个蛋白质分子含有  $n$  个氨基酸残基,而每一个残基又有 2 个键能够旋转,则主链中对每一个能旋转的键,就有三种可能的构象( $\phi$  或  $\psi$  角)。其可能构象的最大数目是  $3^{2n}$ , 约等于  $10^n$ 。由于每一单键在大约  $10^{-13}$  秒内进行完全的旋转,因此主链中每种形式的单键旋转一次所需要的总时间为  $2 \times 10^{13}$  秒。所以假定一条多肽链试验出每种可能的构象所需的时间为  $t$ ,  $t = 10^n / 2n \times 10^{13}$ 。对于一条含 8 个残基的多肽链,  $t$  值在微秒范围内。一条含 14 个残基的多肽则约为 0.4 秒。但是对于含有 100 个氨基酸残基的多肽链,它约需要  $5 \times 10^{81}$  秒,或者说比地球的年龄还长。然而含有 149 个氨基酸残基的葡萄球菌核酸酶,在用酸处理使之完全变性后,它至多需要 0.1—0.2 秒即可重获得具有酶活性的天然构象。实际上,蛋白质分子通过某些有利的途径,非常迅速地折叠成它们的天然构象,这是生物学上的需要。因为细胞中蛋白质的合成非常快,其进行速率超过每秒钟接一个氨基酸残基。

那么,一个长多肽链怎样在事先无需试验其全部可能的构象,就能如此迅速地折叠成其天然构象呢? 虽然完全的回答尚不知道,但是看来协调性 (cooperativity) 的原理有助于此过程的进行。即在多肽链的某部分一旦已有少数弱键 (氢键或疏水性相互作用力) 正确形成,它们就会大大提高形成新的正确键的概率,而无需多肽链去试验全部可能的构象。无规线圈状的多肽链好像经历了

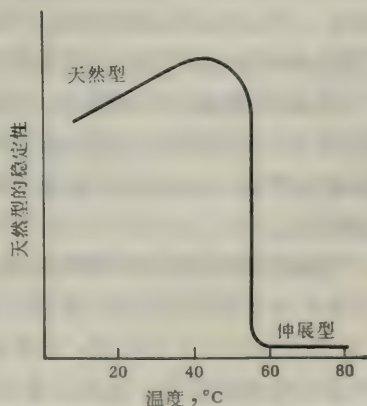


图 6-18 一种蛋白质的加热“解链”曲线。经过一极短的温度间隔,发生了朝伸展型的急剧转变,这表明伸展或变性是一个协调性过程,此时最初少数弱键的破裂将大大增加其余键破裂的可能性。

一种核晶过程,这与盐的过饱和溶液的情况相似,当以细小晶体作为核晶或种子时,溶液就立刻结晶出来。这个折叠过程究竟是由多肽链的一端或另一端开始,或者是在链的中间开始,目前还未阐明。蛋白质的加热伸展显示为颇陡急的“解链”曲线(图 6-18)。它提示多肽链仅以两种状态存在,即完全折叠型或完全伸展型。然而,最近研究了在极短时间隙内蛋白质的伸展,证明某些蛋白质也可以形成中间构象状态。或许这些工作将揭示,在生物学条件下多肽链的伸展和折叠是如何始动与传播的。

## 低聚蛋白的四级结构

我们已经知道,某些球状蛋白是低聚物,即含有两个或多个分开的多肽链或亚基(表 3-2)。四级结构是指低聚蛋白的天然构象中各条折叠的多肽链互相契合而组成特定形式。血红蛋白是最简单的低聚蛋白之一,它有四条多肽链。

因为低聚蛋白的分子量比较大,而且它们含有多条链,每条链又可能表现为特定的构象,所以用 X 射线法来分析它们的立体构象,较之单链蛋白质困难得多。

### 血红蛋白

血红蛋白是第一个用 X 射线分析法已阐明其完整的三级和四级结构的低聚蛋白。Perutz 及其共同工作者在英国完成的这项成就就是他们 25 年以来详细研究该重要蛋白质的结构获得的精华。因为肌红蛋白和血红蛋白的多肽链具有相似的功能和同系的氨基酸顺序,在同一实验室里同时进行了这两种蛋白质结构的研究,发展了两者间的许多非常重要的关系。

血红蛋白含有两条  $\alpha$  链(141 个氨基酸残基)和两条  $\beta$  链(146 个氨基酸残基),每条链以非共价键结合一个血红素残基。对这个分子的氧化型进行了检查,发现它具有致密的球状结构,大小为  $6.4 \times 5.5 \times 5.0$  毫微米。图 6-19 表示了血红蛋白多肽链的低分辨率的轮廓。图 6-20 则表示这些多肽链如何装配在一起,组成近似的四面体排列。每条多肽链有一个不规则折叠的构象,在此构象中纯  $\alpha$  螺旋区的长度由弯折隔开。正如肌红蛋白那样, $\alpha$  和  $\beta$  链两者表现出大约 70% 的  $\alpha$  螺旋特性, $\alpha$  和  $\beta$  链的三级结构彼此非常相似,它们由相似长度的  $\alpha$  螺旋,以大致相同的角度和方向弯折而成。但最值得注意的是, $\alpha$ -和  $\beta$ -链的三级结构与肌红蛋白单链的结构非常相似。这点与两种蛋白质具有相似的生物学功能是一致的,即肌红蛋白在肌肉中,以及血红蛋白在血液中都显示有与氧可逆结合的能力。

在血红蛋白的两条  $\alpha$  链和两条  $\beta$  链之间接触是非常少的,但是在不同链的配对之间却有许多 R 基团相互接触。特别有趣的是四个血红素基团的定位,每个亚基含有一个血红素,它们共结合 4 分子的氧。这些血红素基团是扁平状分子,其中所含的铁原子形成正方形平面的配位络合物。血红素基团彼此隔开很远,相互间处于不同的角度(图 6-20)。每一个血红素都部分地包藏在有非极性 R 基团环绕的口袋内。每一个铁原子的第五个配价键连接在一个组氨酸残基的咪唑氮原子上,而其第六个位置可用来与一个氧分子形成配价键。在血红蛋白分子内部,存有一个以极性 R 基团为界沿的中央腔。

已经比较了许多种属的血红蛋白链的氨基酸顺序。虽然在每条链上仅有 9 个氨基酸





图 6-19 血红蛋白  $\alpha$  和  $\beta$  链的三级构象[引自 Cullis, A.F. et al., *Proc. R. Soc. Lond.*, A265: 161 (1962)]



图 6-20 血红蛋白的四级结构[改绘自 R. E. Dickerson and I. Geis, *The Structure and Action of Protein*, 1969]

残基是绝对不变动的,氨基酸在许多其他位置上可被置换,这点表明几乎所有种属的血红蛋白多肽链亚基都具有相同的三级结构。而且在几乎所有的血红蛋白中,都有一个组氨酸 R 基与血红素基团上的铁原子以配价键结合。

现在已经确定了其他低聚蛋白的四级构象,特别是也含有四条多肽链的乳酸脱氢酶。关于它们的结构以及含有 12 条多肽链的天冬氨酸转氨甲酰酶的结构,将在别处讨论。

### 血红蛋白的氧合作用和脱氧作用

脱氧血红蛋白的 X 射线分析证明,其四个亚基多肽链的四级结构与氧合血红蛋白是一致的。但是在此四级结构中,也就是在这些链如何彼此相关地定向方面,已发生了明显的变化。在脱氧作用时, $\alpha$  链旋转约  $9^\circ$ , $\beta$  链旋转约  $7^\circ$ ,但这是沿着不同的轴旋转的,以致引起了四个亚基间的接触点改变,并在它们之间形成新的离子键。两个  $\alpha$  血红素之间变得更接近 0.1 毫微米,而两个  $\beta$  血红素则比原来离开约 0.65 毫微米。因此,四个氧分子的结合(每个氧分子仅具有较小的直径),能引起血红蛋白的四级结构发生深刻变化。这种变化的意义,现将在下面讨论。

### 血红蛋白的结合平衡

在红细胞内,血红蛋白分子的功能是作为氧的携带者,从富于氧气相的肺将氧转运到氧贫乏的外围组织。在上述功能中,血红蛋白分子与氧结合的特殊方式具有相当的重要性。

血红蛋白约占红细胞总蛋白质的 90%,它们集中分布于胞浆中。因为血红蛋白具有

与氧结合的能力,每 100 毫升全血能吸收 21 ml 的气态氧,而血浆通过物理溶解仅能单独吸收约 0.3 毫升的氧。将血红蛋白的百分饱和度对氧分压作图,绘得的曲线呈 S 形(图 6-21);而肌肉中的肌红蛋白只含有单个血红素基团和一条多肽链,对它进行同样的绘图则得到一双曲线。血红蛋白与氧结合的 S 形曲线的意义是,血红蛋白开始结合一个或两个氧分子时,其亲和力较低;但是一旦它们发生了结合,就会显著促进继后的氧分子的结合。反之,当氧分压下降时,从充分氧合的血红蛋白失去一个氧分子,将引起其余的氧分子更易解离。

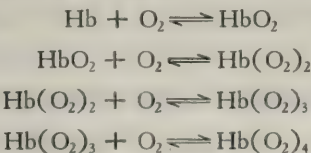
血红蛋白-氧平衡的位置也受 pH 的影响(图 6-21)。在一已知的氧分压下,血红蛋白溶液的 pH 值越高,与氧的百分饱和度则越大。与此可逆的效应也能发生,因为当血红蛋白与氧结合时,它会按照下列方程式进行电离,每结合一个氧分子就释放一个质子:



这里  $\text{HHb}^+$  是脱氧血红蛋白分子的一个质子化亚基。由于这个反应完全可逆,增加氢离子浓度将引起平衡向左侧移动,即降低了氧饱和度;而减少氢离子浓度,又将引起平衡向右侧移动,即增加了氧饱和度。pH 对氧-血红蛋白平衡的这一作用,叫做 Bohr 效应。

在调节血红蛋白运输氧的功能上,氧分压和 pH 是两个最重要的因素,在肺部,氧的分压高(约 100 毫米汞柱),而且 pH 也比较高,此时血红蛋白被氧饱和的数量达最大值,约为 96%(见图 6-21)。在周围组织内部,氧的张力低(约 45 毫米汞柱),而且 pH 也低(由于作为呼吸的终产物而生成的  $\text{CO}_2$  达到很高浓度),此时血红蛋白与氧结合的能力较弱,因此将释放部分氧给呼吸细胞群,直到血红蛋白的氧饱和度下降到约 65% 为止。在作为氧的载体的功能中,血红蛋白的氧饱和度在 65% 到 96% 之间循环。

血红蛋白与氧结合的 S 曲线,已成为许多研究和思考的课题。因为它显然反映了血红蛋白分子的生物学适应功能,从而让它以最大的分子效率发挥作用。血红蛋白的逐步氧合作用所涉及的平衡,可表示在下列反应中(为简化计,未包括质子平衡):



问题是要求解释:血红蛋白分子的亚基究竟如何通过偶联或连接,以致使它们当中一个亚基与氧结合将对其它亚基发出信号,并能增加它们与氧的亲和力。已经提出了两

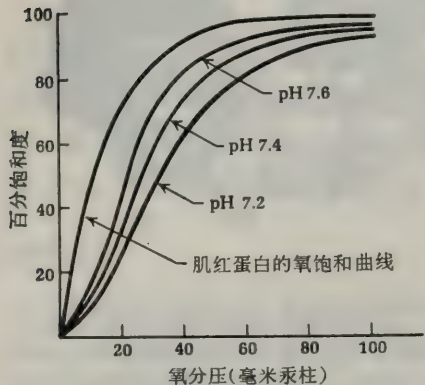


图 6-21 血红蛋白和肌红蛋白的氧饱和曲线。血红蛋白的 S 形饱和曲线及其对 pH 变化的反应,可使血红蛋白在肺中几乎完全被氧饱和(氧分压为 100 毫米汞柱, pH 7.4),并使它将其所携氧量的 30% 以上在组织中释放(此时氧分压为 45 毫米汞柱, pH 7.2)。肌红蛋白的氧饱和曲线是一矩形双曲线,故在相同条件下只能使所携氧大约释放 2—3%。在人的红细胞中,血红蛋白同代谢物 2,3-二磷酸甘油酸紧密地结合,但脱氧血红蛋白只与它呈微弱的结合。通过降低血红蛋白对氧的亲和力,这个配基具有进一步加速氧分子释放的效应。因此,在运输氧的过程中,2,3-二磷酸甘油酸可作为血红蛋白活性的一种抑扬调节剂。



种总模型,来说明当血红蛋白发生氧合时其亚基之间的相互作用(图 6-22)。这两者都假设,血红蛋白分子的每一亚基能以两种不同的构象存在,一种对氧有高度亲和力,其他一种与氧的亲合力较低。第一种模型系多年前由 Adair 提出,且最近由 Koshland, Jr. 及其共同工作者改进和重新提出,它叫做顺序模型(图 6-22)。当一个氧分子与一个已知亚基结合时,该亚基即改变其构象,成为高亲和力型。而后者的分子由于同邻近分子接触,就能增加下一个亚基转换成高亲和力型并与第二个氧原子结合的可能性,以此类推,直到全部四个氧都被结合,所有四个亚基都处于高亲和力构象为止。顺序模型的特征是,血红蛋白分子经历了一系列中间的构象状态。

Monod, Wyman 和 Changeux 提出了另一种总模型——对称模型(图 6-22)。他们假定,血红蛋白分子仅存在两种形式:一种是全部亚基都属于低亲和力形式,另一种是全部亚基都属于高亲和力形式。在这种模型中,血红蛋白分子总是对称的,即它的全部亚基都

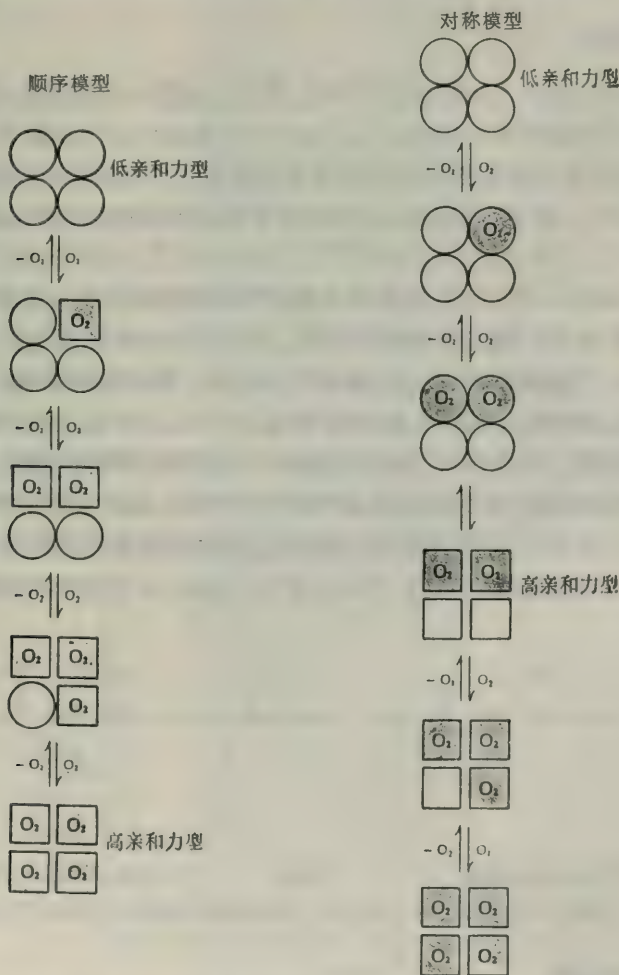


图 6-22 说明血红蛋白与氧的协调性结合的顺序模型和对称模型。这些模型不仅可用于血红蛋白,也可用于表现配基与其亚基进行连接性或协调性结合的其他低聚蛋白。在两种模型中,圆圈表示对氧具低亲和力的亚基构象,而方块则表示对氧具有高亲和力的亚基构象。顺序模型假设,一个氧分子与一亚基的高亲和力型的结合,将增强其余的亚基在依次与氧结合时转变成高亲和力型的趋势。对称模型推测,两个氧分子的结合已足够牵动平衡,使全部亚基处于高亲和力型状态。

处在一种或另一种状态。

虽然这两种模型都能解释血红蛋白的 S 形氧合曲线,但现在的证据却有利于第二种或对称模型。特别是 X 射线分析提供了有关氧合血红蛋白与脱氧血红蛋白之间存有结构差异的证据。Perutz 已经假定,首先的两个氧可结合到  $\alpha$  亚基上,改变它们与  $\beta$  亚基间的离子相互作用,从而引起两个 Bohr 效应质子的释放,于是全部四个亚基均转换成高亲和力和型。剩余的两个亚基以很大亲和力与氧结合,随后释出其他两个 Bohr 质子。

血红蛋白是许多低聚蛋白的一种模型或原型。这些蛋白质在它们的每一个由两条或多条多肽链组成的亚基上,结合有两个或多个配体分子。在这些低聚蛋白中,有叫做变构酶类的调节酶组,将在第九章讨论。某些变构酶对改变其底物浓度的反应,与血红蛋白对氧分压变动的反应相似,即当底物浓度增加时酶的活性可出现 S 形增高。顺序和对称模型两者(图 6-22)都已用来分析变构酶的功能;在许多情况下,顺序模型显得更合适些。

镰状血红蛋白的构象

在镰状细胞血红蛋白(血红蛋白 S)中,其  $\beta$  链的第 6 位谷氨酸残基被缬氨酸取代。这种变化使患镰状细胞性贫血病人的红细胞在低氧张力时变成新月形或镰刀形(图 5-19),而正常红细胞在脱氧作用时仍维持其盘状形态。这些事实表明,HbS 分子的构象不同于正常 HbA,在镰状红细胞内 HbS 分子的填充能引起脱氧合时红细胞形状的改变。

Cerami 和 Manning 已发现,在体外以氰酸钠处理镰状细胞性贫血病人的红细胞,能在氧张力减低时大大阻止红细胞变成镰刀形。当把这样的细胞再输回到病人时,它们也存活较长,而且其功能显然较未处理过的镰状细胞好。氰酸盐的处理,可引起 HbS 的 N 末端缬氨酸残基上的游离氨基发生氨甲酰化(图 6-23),这个反应具有移除正常存于该氨基上的正电荷的作用。因此,仅改变血红蛋白分子的单个带电荷基团,看来好像就能“纠正”它的构象,使这些分子能再度正常地被氧合和脱氧,而不出现红细胞的明显镰状化。而且氰酸盐的这一效应似乎具有很高的选择性,并不导致血红蛋白中其他氨基的变化。现在正在检验这种氰酸盐效应,看它是否可能用于临床,以处理镰状细胞性贫血病发生的危象。

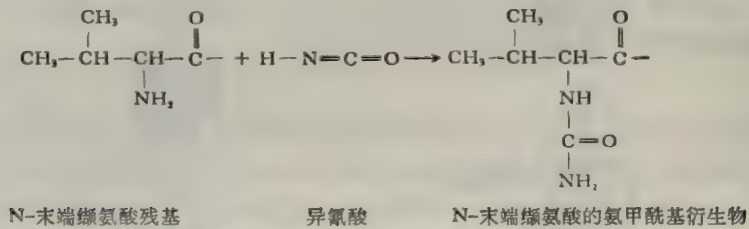


图 6-23 在镰状细胞血红蛋白的  $\beta$  链中,其 N 末端缬氨酸残基的氨甲酰基衍生物的形成。

低聚蛋白的解离和变性

当具有两条或多条多肽链亚基的蛋白质遭受到引起变性的因素作用时,如强酸性、加热、高浓度的尿素或胍等,它们的构象将经历两阶段变成较无规的形式:(1)多肽链相互解离;(2)分开的多肽链伸展为无规线圈。如果非常细心地进行处理,有时能使低聚蛋白



的多肽链彼此分离，而不损坏其正常的三级结构。例如血红蛋白能被盐解离为两个半分子，即两个  $\alpha\beta$  亚基。当过多的盐经透析除去后，原分开的亚基又可以结合起来，重新组成具完全活性的低聚蛋白。

然而，如使用了更剧烈的实验条件，这些多肽链亚基不仅将被分离，而且也会伸展成无规线圈。虽然可以期望，已完全变性的低聚蛋白如要自动地重新折叠以恢复到天然形式，这将比只含有单条多肽链的单纯蛋白质困难得多，但仍然有许多低聚蛋白能进行完全可逆的变性。例如，醛缩酶的酸化可引起它的四个亚基分离和伸展；当 pH 升到约 7.0 时，这些亚基将自发地重新折叠成其天然的三级结构，并再缔合生成具催化活性的低聚体酶。这些事实表明，在低聚蛋白中多肽链的氨基酸顺序不仅能特异地决定二级和三级结构，而且也能决定接触位点的几何模式。这样就能使亚基的多肽链达到严格的相互契合，从而获得彼此间非常紧密的四级缔合结构。这些特点赋予某些低聚蛋白（如醛缩酶和血红蛋白）以自身组装的能力。

### 蛋白质构象的探测

在发挥其生物学功能的过程中，蛋白质分子（特别是酶），常发生构象的变化。用某些物理测量方法，能检定这些改变。我们已经知道，由于  $\alpha$  螺旋具有内在的不对称性，测定多肽的旋光度就可以告诉我们，它们究竟是以无规线圈存在或者还是以  $\alpha$  螺旋形式存在。在另一类称为旋光色散的光学测定方法中，于入射光波长的一定范围内对蛋白质分子的旋光进行扫描。图 6-24 表示了一种天然蛋白质的典型旋光色散图。在约 234 毫微米处有一深波谷出现。旋光度数值伴随光波长而发生的这样一种急剧变化，叫做 Cotton 效应；大多数蛋白质在大约 225 至 235 毫微米范围显示 Cotton 效应。一种蛋白质在这些折点或临近这些折点的旋光度，是其构象变化的极敏感的指标。蛋白质的圆二色性测定是研究其构象变化的另一个灵敏试验。当圆形或椭圆形偏振光通过一蛋白质溶液时，因入射光的右旋和左旋成分不等的吸收，可使透过光产生平面偏振现象。

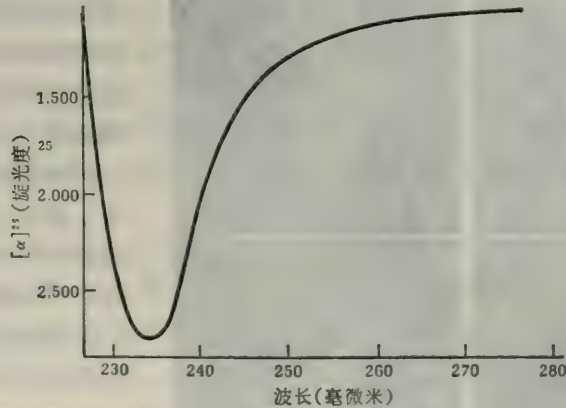
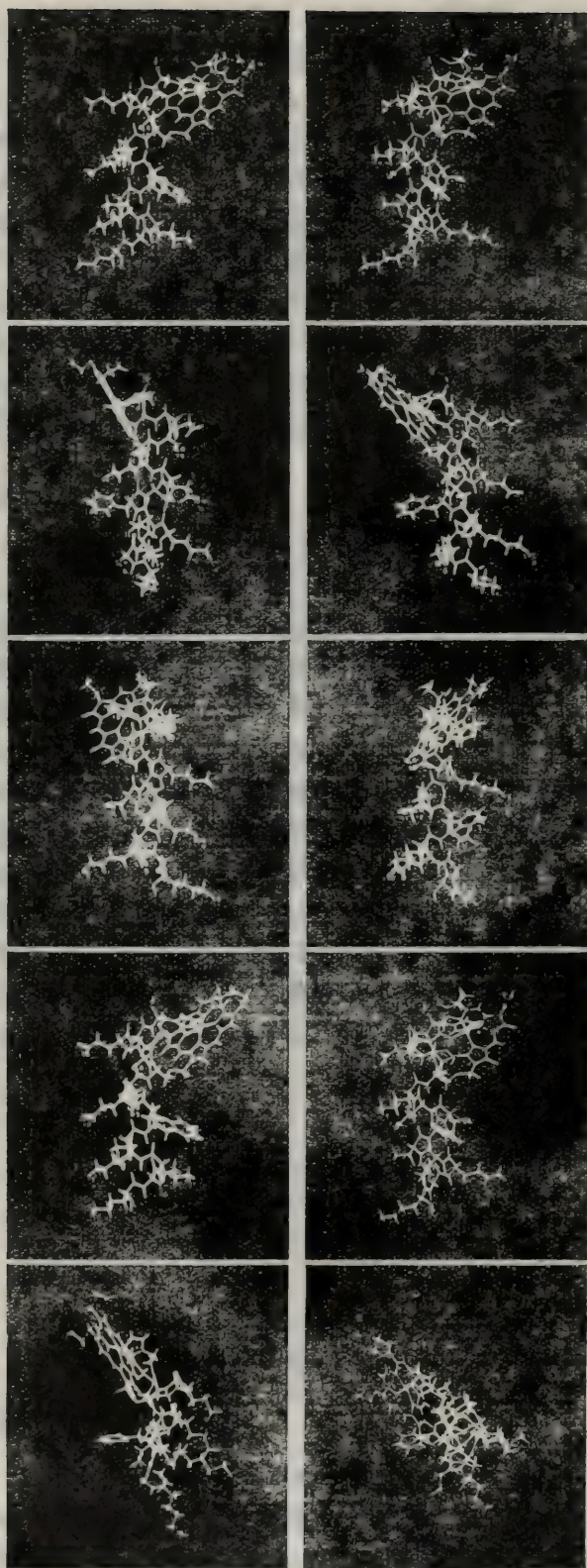


图 6-24 一种典型蛋白质的旋光色散曲线，显示了在 234 毫微米处的 Cotton 效应。在蛋白质与配体分子结合时，也能产生 Cotton 效应；它们出现时的波长常比这里图示的内在 Cotton 效应者为长。

另一个检定蛋白质在溶液中立体构象变化的灵敏方法是观测其荧光变化。当三种芳香族氨基酸（苯丙、酪和色氨酸）被可见光或紫外光激发时，它们将发出荧光，即发射不同于



入射光波长的光。发射的荧光与被吸收的入射光的比率,叫做量子产量。它对环绕芳香族氨基酸 R 基团的环境中小范围的变化非常敏感。另一个有关的方法,叫荧光偏振法。它是用平面偏振光激发蛋白质,再观测发射的荧光的偏振度,即可获得有关蛋白质的大小、形状和旋转运动的有价值的知识。

核磁共振 (NMR) 光谱学也已成为一种极有效的工具,可用来检定天然蛋白质分子中有哪些氨基酸残基参与了构象变化。将蛋白质放入一个强度不等的振荡磁场,某些电磁辐射将被具有非零角自旋力矩的原子核,特别是氢和氘的原子核所吸收。由于不同类型功能基( $-\text{OH}$ ,  $=\text{CH}-$ ,  $-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{CH}_3$ ) 的质子显示不同而特异的磁共振,故通过 NMR 观测就能检定这些基团的局部环境变化。NMR 光谱学的改进有殊特重要意义,因为它能感受少量存在于蛋白质天然碳中的同位素  $^{13}\text{C}$  的角距。采用这种有效的方法,就可能观测肽链碳原子、 $\alpha$ -碳原子、不饱和的与芳香族 R 基团周围环境的变化。借助于这些新方法,也就能检定多肽链的哪一特殊部分经历了构象变化。

使用电子计算机,可以展

图 6-25 当模型沿着分子的垂直轴旋转时,显示一条多肽链的主链结构的计算机演算图象。[绘自 C. Levinthal, *Scientific American*, November 1966]



示或画出蛋白质分子多肽链主链的三维构象。(图 6-25)

### 三级结构的推测

如果蛋白质分子的二级和三级构象,能反映多肽链通过一个残基接着一个残基的调整以产生局部的最小自由能状态的情况,则理论上从 $\phi$ 与 $\psi$ 角施加于每条肽链上的约束力开始考虑,似乎能根据其氨基酸顺序来预测一种已知蛋白质的完全的三级结构。现在正试图借助电子计算机来实现这样的计算。对每一个氨基酸残基而言,必须按照相邻R基团的静电、范德瓦尔斯力和空间的相互作用资料,计算其最小的自由能构象。从氨基酸顺序虽然尚不能预测蛋白质的完全构象,因为必须考虑的大、小范围因素非常复杂,但是朝着这个目标正在取得明显的进展。

### 摘 要

每种蛋白质至少具有一个立体构象,在适应生物的温度和pH条件下,它既稳定又显示活性,这就是它的天然构象。 $\alpha$ -角蛋白、毛发和羊毛的纤维状蛋白等的X射线分析表明,它们的多肽链是右手 $\alpha$ 螺圈,每一圈含有3.6个氨基酸残基,以最大的链内氢键相连。在 $\alpha$ 螺旋中,每一肽羰基氧原子与相隔三个氨基酸残基的肽键—NH—形成氢键。胱氨酸的双硫交联键使 $\alpha$ -角蛋白的平行 $\alpha$ 螺圈维系在一起。丝的丝心蛋白是一种 $\beta$ -角蛋白,它具有折叠片结构,在该结构中多肽主链以多肽链的伸展或 $\beta$ 构象出现,并借链间氢键交联起来。纤维状蛋白——胶原的三条链由三股纽结的左手螺旋组成,它们互相缠绕,形成了一根胶原纤丝的原胶原的基本重复单位。胶原富含甘氨酸、脯氨酸和羟脯氨酸。

球状蛋白(如肌红蛋白)的X射线分析表明,其多肽链呈紧密折叠,故在内部留给水分子的空间很小。球状蛋白的全部或几乎全部极性R基团都位于分子表面,并被水化,而疏水性残基则隐蔽在里面。随着它们的氨基酸顺序不同,球状蛋白所含的 $\alpha$ 螺旋或 $\beta$ 构象在数量上变化很大。脯氨酸残基在 $\alpha$ 螺圈中形成弯折。

多肽链主链的构象自动地决定于:(1)刚性平面肽基;(2)对围绕 $C_{\alpha}$ —C和 $C_{\alpha}$ —N单键的旋转角度( $\phi$ 和 $\psi$ 角)的限制,以及(3)R基团的大小、极性和所带电荷。有些变性的或伸展的蛋白质,可以非常迅速和自发地重新折叠成其天然构象,尽管事实是,要试验全部可能的构象所需要的时间几乎是无限长的。在自发的重新折叠过程中,发生了协调性相互作用。

低聚蛋白的四级结构(如血红蛋白),也决定于其组成多肽链的一级氨基酸顺序。血红蛋白能以这样一种关系与四个氧分子结合,即它表明了这些亚基彼此间的协调作用。与氧的结合则伴有亚基的构象改变。许多低聚蛋白与配体的结合,可引起其构象状态的改变。这点能从两方面加以解释,即相邻亚基的顺序转变或整个低聚体分子的对称性全或无转变。

## 参 考 文 献

### 书籍

- Dickerson, R. E., and I. Geis: *The Structure and Action of Proteins*, Benjamin, Menlo Park, Calif., 1969. With a stereo viewing supplement.
- Haschemeyer, R. H., and A. E. V. Haschemeyer: *Proteins: A Guide to Study by Physical and Chemical Methods*, Wiley, New York, 1973.
- Neurath, H.: *The Proteins*, 2d ed., 4 vol., Academic, New York, 1964—1966.
- Tanford, C.: *The Hydrophobic Effect*, Wiley-Interscience, New York, 1973. A short, valuable book on the physical chemistry of hydrophobic interactions, stability of proteins, and formation of lipid micelles and membranes.
- Wilson, H. R.: *Diffraction of X-rays by Proteins, Nucleic Acids and Viruses*, St. Martin's, New York, 1966. An elementary account of the x-ray technique.

### 论文

- Anfinsen, C. B.: "Principles That Govern the Folding of Polypeptide Chains," *Science*, 181: 223—230 (1973). A Nobel prize lecture recapitulating the early history and recent progress.
- Blow, D. M., and T. A. Steitz: "X-Ray Diffraction Studies of Enzymes," *Ann. Rev. Biochem.*, 39: 63—100 (1970).
- Cerami, A., J. M. Manning, and others: "Effect of Cyanate on Red Blood Cell Sickling," *Fed. Proc.*, 32: 1668—1672 (1973).
- Darnall, D. W., and I. M. Klotz: "Subunit Constitution of Proteins: A Table," *Arch. Biochem. Biophys.*, 166: 651—682 (1975). Valuable compilation of the number and molecular weight of subunits of proteins.
- Dickerson, R. E.: "X-Ray Studies of Protein Mechanisms," *Ann. Rev. Biochem.*, 41: 815—842 (1972).
- Gallup, P. M., O. O. Blumenfeld, and S. Seifter: "Structure and Metabolism of Connective Tissue Proteins," *Ann. Rev. Biochem.*, 41: 617—672 (1972).
- Harte, R. A., and J. A. Rupley: "Three-Dimensional Pictures of Molecular Models," *J. Biol. Chem.*, 243: 1664—1669 (1968). Three-dimensional "xographs" of lysozyme.
- Hewitt, J. A., J. V. Kilmartin, L. F. Ten Eyck, and M. F. Perutz: "Noncooperativity of the  $\alpha\beta$  Dimer in the Reaction of Hemoglobin with Oxygen," *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.)*, 69: 203—207 (1972).
- Kendrew, J. C.: "The Three-Dimensional Structure of a Protein Molecule," *Sci. Am.*, 205: 96—110 (December 1961).
- Koshland, D. E., Jr., G. Nemethy, and D. Filmer: "Comparison of Experimental Binding Data and Theoretical Models in Proteins Containing Subunits," *Biochemistry*, 5: 365—385 (1971).
- Levinthal, C.: "Molecular Model-Building by Computer," *Sci. Am.*, 214: 42—52 (June 1966). Computer representation of protein conformations.
- Ramachandran, G. N., and V. Sasisekharan: "Conformation of Polypeptides and Proteins," *Adv. Protein Chem.*, 23: 283—437 (1968).
- Tanford, C.: "Protein Denaturation," *Adv. Protein Chem.*, 23: 121—282 (1968); 24: 1—95 (1970).
- Taniuchi, H., and A. N. Schechter: "Chemical and Physical Factors Involved in Protein Folding as Exemplified by Staphylococcal Nuclease," *Panam. Assoc. Biochem. Soc. Rev.*, 1: 419—494 (1973).
- Wetlaufer, D. B., and S. Ristow: "Acquisition of Three-Dimensional Structure of Proteins," *Ann. Rev. Biochem.*, 42: 135—158 (1973).

### 习 题

1. 试计算一条约有 105 个氨基酸残基的多肽链长度(毫微米),如:(a)它完全以  $\alpha$  螺旋形式存在,或(b)如它的主链键充分伸展并呈现线型。

2. 在下列这条多肽中:(a)你认为在 pH 7.0 时,哪一部分将会有  $\alpha$  螺旋构象;(b)在何处会出现弯折点,以及(c)在何处可能形成交联键?

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20  
异亮-丙-组-苏-酪-甘-脯-苯丙-谷-丙-丙-蛋-半胱-赖-色-谷-谷-谷-脯-天冬-  
21 22 23 24 25 26 27 28  
甘-蛋-谷-半胱-丙-苯丙-组-精



3. 烟草斑纹病毒的蛋白质鞘膜含有 2,130 个相同的亚基多肽链,而每条链又由 130 氨基酸残基所组成。假如嵌入一个氨基酸时出现的每一误差将产生一个被摒弃的缺陷亚基,又假如完整的活性病毒粒子的最后产量等于组成的病毒多肽总量的 50%,试计算可能误差的最大频率(每 1,000,000 残基中的数目)。假设病毒的整个外壳仅由一条多肽链组成,试重复上述计算。

4. 已知蛋白质的多肽链的一些段节是  $\alpha$  螺旋,而另一些段节则有  $\beta$  构象。这个蛋白质的分子量为 240,000,其外周长度为  $5.06 \times 10^{-7}$  厘米。试算出此分子中以  $\alpha$  螺旋构型存在的那部分。

[胡惠廉译 卢义钦校]

## 第七章 蛋白质：提纯与鉴定

我们已经清楚(正如第三一六章所介绍),每一类细胞可能含有成千种不同的蛋白质,而每一种属的生物又含有一整套在化学上不同于其他生物的有特色的蛋白质。蛋白质是比较脆弱的分子,只能在较窄的 pH 和温度范围内保持其生物活性。因此,将一种已知的蛋白质以纯品的形式从一已知的细胞或组织中分离出来,会显得是一件困难的任务,特别由于任一已知蛋白质在细胞内浓度极低,而且是与成千种其他蛋白质并存的。然而,尽管有这些困难,还是分离出了大量的各种纯品蛋白质。况且,分离蛋白质的近代方法具有异常高的分辨率。

本章将叙述奠定蛋白质分离技术的物理学原理,提纯蛋白质所采用的部署,以及测定其分子量的某些方法等。虽然在本章中对蛋白质的生物学很少讨论,但我们目前所以能获得许多有关其生物学的知识,是由于利用了高度提纯的蛋白质制品。分离它们需要付出无数辛勤的劳动,以及做一些大多是默默无闻的工作。

### 蛋白质在溶液中的行为

虽然认识蛋白质已达一个多世纪,但是直到较近的年代根据非常深入的物理化学研究,我们才获知了有关它们在水体系中作为溶质的行为。在认识蛋白质结构以前的许多岁月里,蛋白质被当成具有神秘性质的物质,在作为溶质的行为上认为与其他种类的分子很不一样。长期以来,还认为蛋白质在溶液中是由胶粒所组成,其分子量是不定的和易变的。在将生物分子的研究转变成一门精确而严谨的科学方面,Emil Fischer 的贡献超过任何其他化学家。直到 1916 年,他仍断然否定蛋白质具有 5,000 以上的分子量,他确信蛋白质可以聚集成胶粒样复合物。再者,已发现若有中性盐、酸或碱存在时,蛋白质在溶液中的溶解度将经历特别的变化,后者似乎与这些试剂对单纯的小有机分子产生的作用完全不同。

为建立我们的现代概念,需要两代人进行物理化学研究。这些概念包括:蛋白质是具有一定分子量的大分子,可形成真分子溶液。它们又是电解质,其行为也像小的电解质那样遵循同一物理原理。通过许多研究者的努力,有关蛋白质在溶液中的行为的研究以及蛋白质的分离已几乎成为一门精确的科学。

在以下各节中,我们根据五个方面来考虑如何利用球状蛋白在溶液中的各种特性以进行蛋白质混合物的分离。它们是:(1)分子大小;(2)溶解度;(3)电荷;(4)吸附特性的不同;(5)对其他分子的生物学亲和力。

### 根据分子大小进行分离的步骤

蛋白质最突出的特性是它们的分子大,这就使我们能利用简单方法把蛋白质与小分



子分开,也使分辨蛋白质混合物的方法成为可行。

### 透析与超滤

采用透析(图 7-1) 可以很容易将溶液中的球状蛋白同低分子量的溶质分开。透析是利用一张半透膜以阻留蛋白质分子而让小溶质分子与水通过。将蛋白质与小分子分离的另一方法则是超滤(图 7-2),它是运用压力或离心力使水介质与小溶质分子通过一半透膜,而蛋白质分子却被此膜阻留。此类步骤通常可采用玻璃纸和其他合成材料。

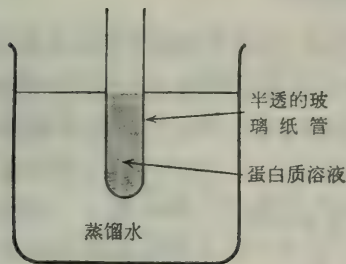


图 7-1 透析。由于装有蛋白质溶液的膜是半透膜,水和小溶质分子如葡萄糖或硫酸铵能自由透过,而蛋白质却不能。用新制蒸馏水将膜外的水相掉换几次,蛋白质溶液中小溶质分子的浓度就会减少到几乎消失的数量。

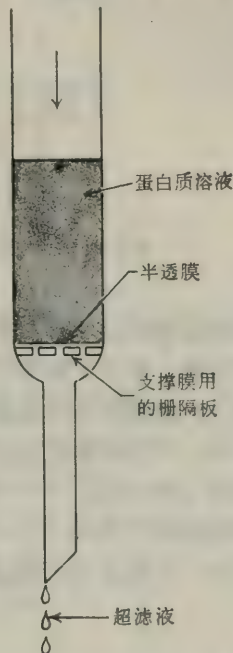


图 7-2 蛋白质溶液的超滤。如在膜上端施加正压(或在膜下端抽真空),由于水和溶解的盐被滤出而使蛋白质浓缩。

### 密度 梯度(区带)离心

因为在高速离心力场内,溶液中的蛋白质表现出沉降倾向,从而克服了扩散的对抗趋势,这样就能用离心法来分离蛋白质混合物。密度-梯度或区带离心是一种可广泛应用和多用途的实验步骤,它不仅能分离蛋白质和他类大分子,而且也能分离细胞器和病毒。最常用的步骤(图 7-3)是,首先在一支塑料离心管中制备一具有连续密度梯度的蔗糖液,其方法设计为:当装管时,使浓蔗糖液同水按递减比值混合,所以介质的密度当以管底最大。而待分离的大分子混合物,则在梯度的顶层。高速离心时,转子中的离心管处在水平位置,致使每类大分子按其各自的速度(这主要取决于其颗粒重量,也取决于其密度和形状)在密度梯度中沉降下来,呈现出分开的区带或节段。通常在达到平衡前即停止离心。蛋白质区带的位置可进行光学定位,或者通过离心管底部的一个针孔,小心吸出管的内容物,进行连续的小样分析。另外,也可将塑料管冻硬,再切成薄片以供分析。

### 分子排阻层析

根据分子大小使蛋白质彼此分离的最有用和最有效的工具之一,是分子排阻层析,也

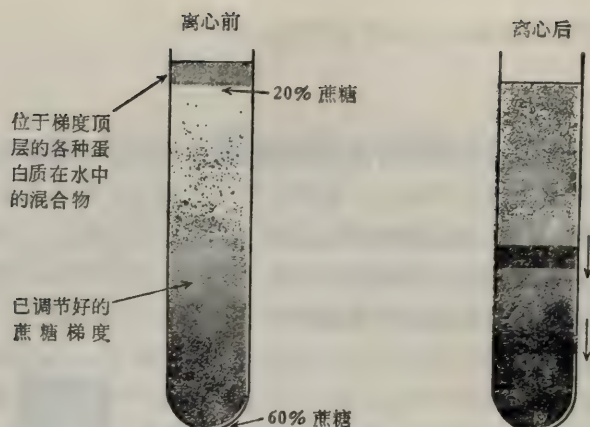


图 7-3 在蔗糖的一个密度梯度中离心, 以实现蛋白质的分离。各个蛋白质质带按其大小、形状和密度而出现。

称为凝胶过滤或分子筛层析。它与离子交换层析不同, 后者系根据溶质的电荷和酸-碱性质进行分离。在分子排阻层析, 让溶于适当缓冲液中的蛋白质混合物通过一根滤柱, 随重力而流下。此滤柱中装有高度水化的惰性聚合物质的珠粒, 事先已单独用缓冲液加以洗涤和平衡。常用的装柱剂计有交联葡聚糖 (Sephadex)——一种多糖衍生物的商品名称; 生物凝胶 (Bio-Gel)——一种聚丙烯酰胺衍生物商品, 以及另一种多糖——琼脂糖。所有这些都能制成内孔径大小不同的制品。在滤柱中, 分子大小不同的蛋白质钻进珠粒内孔的程度不一, 因此它们将以不同速度流下滤柱 (图 7-4)。非常大的蛋白质分子不能进入

显示排阻过程的放大图  
小溶质分子钻进交联葡聚糖珠粒的孔隙, 因而被阻滞。

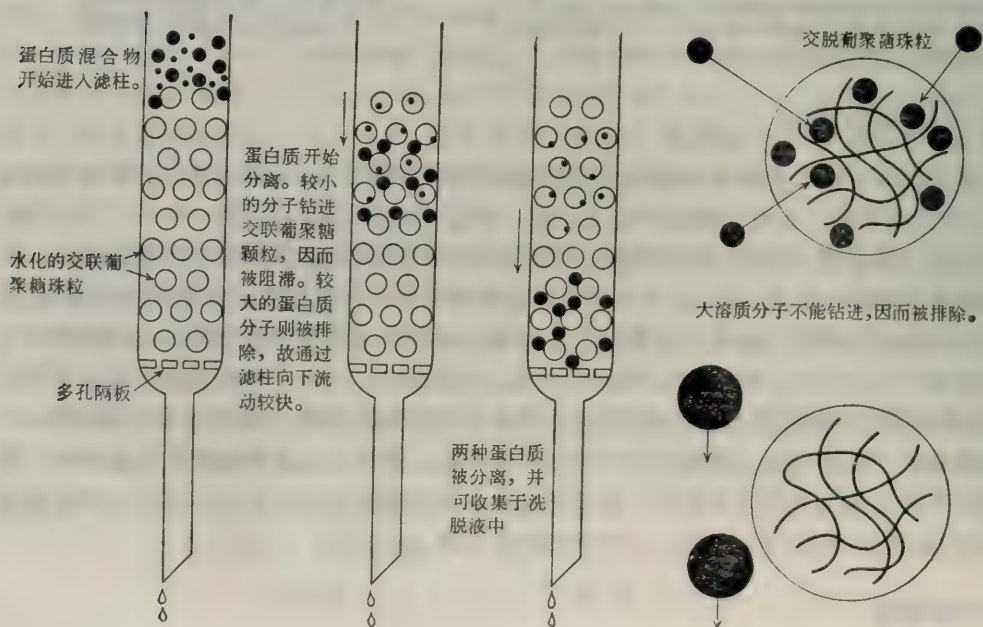


图 7-4 两种大小不同的蛋白质在一交联葡聚糖滤柱上的分离



珠粒孔隙,就说它们是受排阻,因而留在滤柱的被排阻容积之内。已明确它等于珠粒以外的水相容积。另一方面,极小的蛋白质则能自由进入珠粒孔隙(图 7-4)。小的蛋白质将被滤柱阻留,而大的蛋白质由于不能进入水化的聚合物颗粒,就能迅速通过滤柱。至于中等大小的蛋白质受珠粒排阻的程度,将视其大小而定,故称此为排阻层析。测定小部分洗脱液中蛋白质的浓度,即可绘制一条洗脱曲线。(图 7-5)

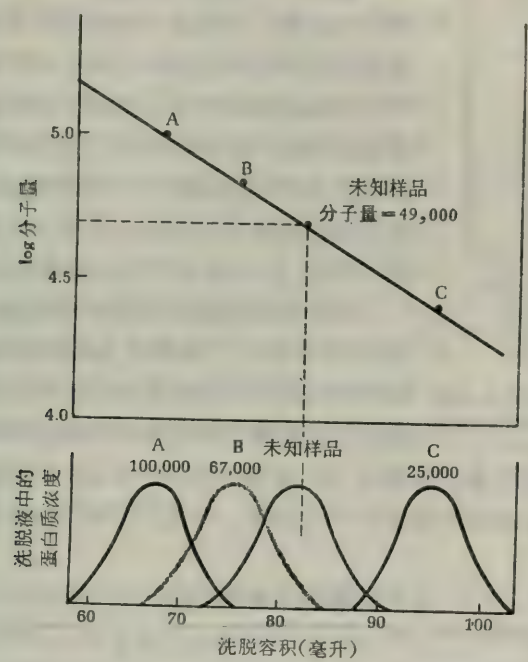


图 7-5 从一分子排阻滤柱上洗脱蛋白质以及测定分子量。为校准滤柱,让分子量已知的几种蛋白质(A、B 和 C)通过滤柱,将它们的最大洗脱容积对分子量的对数绘图。如已求得某未知蛋白质的洗脱容积,则从这样的校正图谱即可外推出它的分子量。此关系仅适用于球状蛋白。至于非球形粒子,其洗脱容积则直接与 Stokes 半径(即具有相当于流体动力学性质的一个球形粒子的半径)有关。

分子排阻层析也可用来分离其他种类大分子的混合物以及非常大的生物结构,例如病毒、核糖体、细胞核甚至细菌等。简单地借助内孔径程度不同的珠粒或凝胶,就可以完成这些任务。分子排阻层析的分辨力很强,所以这个简便方法作为测定蛋白质分子量的一种途径,现已获得广泛应用。

### 按照溶解度差异进行分离的步骤

蛋白质在溶液中的溶解度,将随同下列四个变异数而出现明显变化:(1) pH;(2) 离子强度;(3) 溶剂的介电性质,以及(4) 温度。它们反映了蛋白质是分子量非常大的电解质的事实。由于每种蛋白质具有其特定的氨基酸组成,从而决定了它像电解质的行为,所以可利用这些变异数来分离蛋白质混合物。

#### 等电沉淀

大多数球状蛋白的溶解度,会受到溶液系统的 pH 的明显影响。图 7-6 表示了一

种乳蛋白—— $\beta$ -乳球蛋白的溶解度。不管存在的氯化钠浓度是多少,其溶解度以 pH 5.2—5.3 时为最小。在这临界 pH 的任一侧,溶解度都急剧增大。虽然发生最小溶解度的 pH 值是随各种蛋白质而不同,但几乎所有的球状蛋白均显示了这一特点。

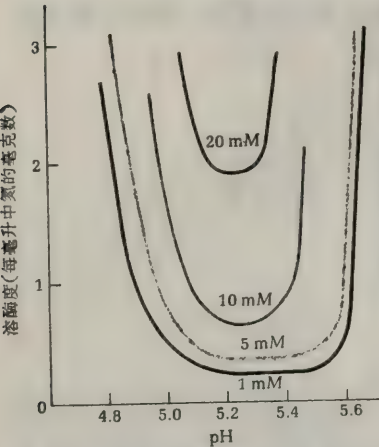


图 7-6 25°C 时 pH 和盐浓度对  $\beta$ -乳球蛋白溶解度的影响。图上表明 NaCl 的浓度。

此组分就大量或全部沉淀下来,而等电 pH 值高于或低于该 pH 的那些蛋白质将剩留在溶液中。被沉淀的等电蛋白质仍维持其天然构象,并能再溶解在 pH 和盐浓度适当的介质中。

蛋白质溶解度最低的 pH 值,是它的等电 pH 值,其定义如后:它是蛋白质分子不带有净电荷,并且不能在电场中迁移的那一 pH 值(表 7-1)。在这些条件下,相邻的蛋白质分子之间不存在静电排斥力,它们表现出聚结和沉淀的倾向。但在高于或低于等电点的 pH 值,所有的蛋白质分子都带有同符号的净电荷,于是它们彼此排斥,并阻止单个分子聚结成不溶的聚集体。实际上,一些蛋白质在其等电 pH 值是不溶解的。

由于不同的蛋白质带有可电离 R 基团的氨基酸含量各异,以致它们的等电 pH 值也不相同,因此常常可以用等电沉淀法使它们相互分离。当一种蛋白质混合物的 pH 被调节到它的一个组分的等电点 pH 值时,则

表 7-1 某些蛋白质的等电点

	等电 pH 值
胃蛋白酶	约 1.0
卵清蛋白	4.6
血清清蛋白	4.9
脲酶	5.0
$\beta$ -乳球蛋白	5.2
$\gamma_1$ -球蛋白	6.6
血红蛋白	6.8
肌红蛋白	7.0
核糖核酸酶	9.6
糜蛋白酶原	9.5
细胞色素 C	10.6
溶菌酶	11.0

对任何已知的蛋白质,由于它能同某些阴离子和/或阳离子结合,所以它的等电 pH 值将随着介质的离子组成而有所变动。当对一蛋白质溶液用蒸馏水进行充分透析以除去  $H^+$  和  $OH^-$  以外的全部小离子时,所得溶液的 pH 值称为等离子 pH 值。任何已知蛋白质的等离子 pH 值都是一个常数。

### 蛋白质的盐溶与盐析

正如图 7-6 和 7-7 所示,中性盐类对球状蛋白的溶解度有显著作用。在低的盐浓度时,能使许多蛋白质的溶解度增加,这是一种称为盐溶的现象。当进行盐溶时,两价离子



的盐类,如  $\text{MgCl}_2$  和  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 比一价离子的盐类,如  $\text{NaCl}$ 、 $\text{NH}_4\text{Cl}$  和  $\text{KCl}$  等,更为有效。中性盐影响蛋白质溶解度的能力,随其离子强度而变动(图 7-7)。离子强度则是观测盐类所提供的阴离子和阳离子浓度及其带有的电荷数目的方法。盐溶效应是蛋白质分子上可解离的 R 基团电离趋势的变化所引起。

另一方面,当离子强度进一步增高时,一种蛋白质的溶解度却开始减低(图 7-7)。待达到相当高的离子强度,这一蛋白质几乎可能完全从溶液中沉淀出来,这种效应称为盐析。盐析的物理化学基础甚为复杂;其中一个因素是:高浓度的盐类可能从蛋白质分子上脱去了起水化作用的水,因此降低了它们的溶解度,但其他因素也与盐析有关。不管它们的物理学基础如何,由于不同的蛋白质对中性盐浓度的反应不一,盐溶和盐析就成为分离蛋白质混合物的一项重要步骤。被盐析沉淀下来的蛋白质仍保持其天然构象,并能再度溶解而常不变性。硫酸铵常被用来盐析蛋白质,因为它在水中的溶解性如此之强,以致可以达到极高的离子强度。

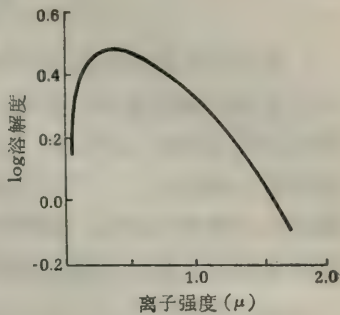


图 7-7 碳氧血红蛋白在等电 pH 时,中性盐 ( $\text{K}_2\text{SO}_4$ ) 对其溶解度的影响。溶液的离子强度  $\mu$  可从  $\frac{1}{2}\sum c_i z_i^2$  求得。该式中  $c$  为浓度,而  $z$  为电荷数。在低离子强度时,蛋白质被盐溶,即其溶解度增大。在高盐浓度时,蛋白质则被盐析。

### 溶剂分级分离

加入可与水溶混的中性有机溶剂,特别是乙醇或丙酮,可使大多数球状蛋白在水中的溶解度降低到如此程度,以致它们将从溶液中沉淀出来。对这种影响的定量研究证明,在固定的 pH 和离子强度下,蛋白质的溶解度取决于介质的介电常数。由于乙醇的介电常数较水为低(见表 2-2),如将它加入蛋白质的水溶液中将会增强相反电荷之间的吸引力,从而降低蛋白质 R 基团的电离度。因此,蛋白质就会聚集和沉淀。根据各种蛋白质在冷乙醇-水或丙酮-水混合剂中的溶解度有量的差异,所以能进行蛋白质混合物的分离。由于这些溶剂在较高温度下可使蛋白质变性,故操作时必须维持较低的温度,这是此法的一个缺点。

### 温度对蛋白质溶解度的影响

正如简单的电解质那样,虽然也有例外,但在大约从  $0^\circ\text{C}$  到  $40^\circ\text{C}$  的有限范围内,绝大多数球状蛋白的溶解度都随温度的升高而增大。超过  $40-50^\circ\text{C}$ ,大多数蛋白质变得越来越不稳定,而且开始变性。通常,在中性 pH 区就有溶解度降低。由于大多数蛋白质在低温下稳定,蛋白质的分级分离步骤一般应在  $0^\circ\text{C}$  或冰库温度进行,然而也有例外。如有些蛋白质在室温下或在其正常细胞环境的温度下最为稳定和溶解度最大。

利用蛋白质溶解度的这四个基本参数,即 pH、离子强度、介电常数和温度,第二次世界大战期间 Cohn 和 Edsall 及其共同工作者于哈佛医学院设计了一套有效的步骤,可以大规模地从人血浆分离各种蛋白质。例如制得的血清清蛋白可用来恢复失血或休克病人的血容量;血清  $\gamma$ -球蛋白或抗体可用于抗麻疹、腮腺炎和其他疾病的免疫;而纤维蛋白原则能促进血液凝固。特别在纯制蛋白质的早期,这些溶解度参数仍被广泛应用,但它们的

分辨力远不如近年发展起来的方法那样高。

## 根据电荷进行分离的步骤

根据蛋白质的电荷进行分离,主要与其酸-碱特性有关,而这又大多取决于其多肽链中可电离R基的数目和类型。由于蛋白质的氨基酸组成和顺序各不相同,每种蛋白质都具有其特有的酸-碱性质。如果我们首先考虑一种已知氨基酸含量的球状蛋白的酸碱滴定曲线,就能对蛋白质的电泳分离中涉及的原理得到充分了解。图7-8表示天然核糖核酸酶的一条滴定曲线。该酶含有124个氨基酸,除N末端与C末端基团外,其中34个氨基酸都带有电离的R基。因此,核糖核酸酶的滴定曲线是反映许多基团电离作用的组合。

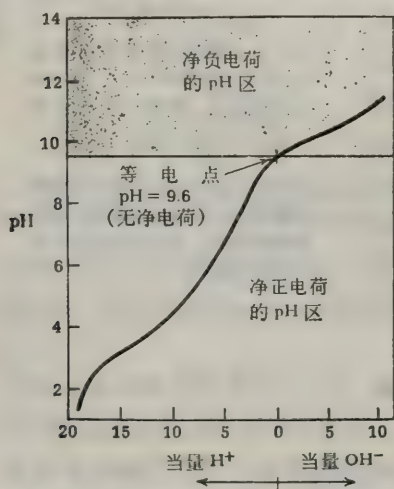


图7-8 核糖核酸酶的滴定。假设滴定从该酶的等电点(pH 9.6)开始,加入酸,使反应进行(到左侧),或加入碱,使反应进行(到右侧)。加 $H^+$ 将引导蛋白质进入具有净正电荷的pH区;而加碱则可引导蛋白质进入净负电荷区。滴定曲线的形状反映了电离基团的数目和类型(见表7-2)。

每一类型电离R基的大致数量,是可以测定出来的(表7-2)。从表中这些资料证明,由于邻近电荷的作用,核糖核酸酶分子中有些类型的R基的平均 $pK'$ 值与游离氨基酸中所含这些基团的 $pK'$ 值稍许不同。核糖核酸酶的全部R基是可以接受酸-碱滴定的,这与从X射线研究获知的概念相符(详见第六章),即几乎天然球状蛋白的所有电离R基都位于其分子的表面。然而,某些天然蛋白质却携有一个或多个不能被滴定的电离基团,据推测这是因为它们被隐藏起来,或者由于它们结成了氢键的缘故。当天然蛋白质变性时,这些隐藏的R基就变成可以被滴定的了。例如,在肌红蛋白的11个组氨酸残基中,除非使蛋白质变性,一般总有5个组氨酸残基的R基不能被滴定。

核糖核酸酶的滴定曲线(图7-8)也表明了它的等电pH。即在此pH值,分子将不带有净电荷,并不能在电场内迁移。而等电pH又决定于电离R基的数目与 $pK'$ 值。若蛋白质的碱性氨基酸(赖氨酸、精氨酸等)含量较高,其等电pH值也将偏高,即大于pH 7.0。核糖核酸酶的情况正是这样,其等电pH值为9.6(图7-8)。若蛋白质分子中的酸性残基(天冬氨酸和谷氨酸)占优势,如在胃蛋白酶,则其等电pH值就会比较低。多数球状蛋白的等电点位于pH 4.5与6.5之间。(表7-1)

一种蛋白质的滴定曲线,在任何已知pH值时也可以表明其净电荷的符号和大小。在大于等电点的任何pH值,蛋白质会带有净负电荷,并将朝正极移动。其负电荷的数量随着pH的升高而增多,这是与滴定曲线的形状一致的。同样,在小于等电点的任何pH值,蛋白质则带有净正电荷,并将朝负极移动(图7-8)。因此,从对一种已知蛋白质的酸-碱特性的了解,使我们有可能预计它在电场中的行为。

在中性盐存在下,由于它们能影响各类R基团的电离程度,以致使一种蛋白质的滴定曲线形状和等电pH值都发生了显著变化。蛋白质也可能与阳离子(如 $Ca^{2+}$ 和 $Mg^{2+}$ )或阴



表 7-2 核糖核酸酶的可滴定基团†

基 团	每分子中的数目		pK' 近似值	游离氨基酸中所含基团的 pK' 值
	根据氨基酸组成	根据滴定曲线		
$\alpha$ -COOH	1		4.7	2.3
R-COOH (谷氨酸, 天冬氨酸)	10		4.7	4.0
咪唑(组氨酸)	4	} 5	6.5	6.0
$\alpha$ -氨基	1		7.8	9.7
酚-OH 基(酪氨酸)	6	} 16	9.95	10.0
$\epsilon$ -氨基(赖氨酸)	10		10.2	10.5
胍基(精氨酸)	4	4	12	12.5

† 关于滴定曲线可参阅图 7-8。

离子(如  $\text{Cl}^-$  或  $\text{HPO}_4^{2-}$ ) 结合。因为这些理由, 所观测到的蛋白质的等电 pH 值, 将多少同溶解它的介质的性质有关。每种蛋白质的等离子点都显示特有的恒定。

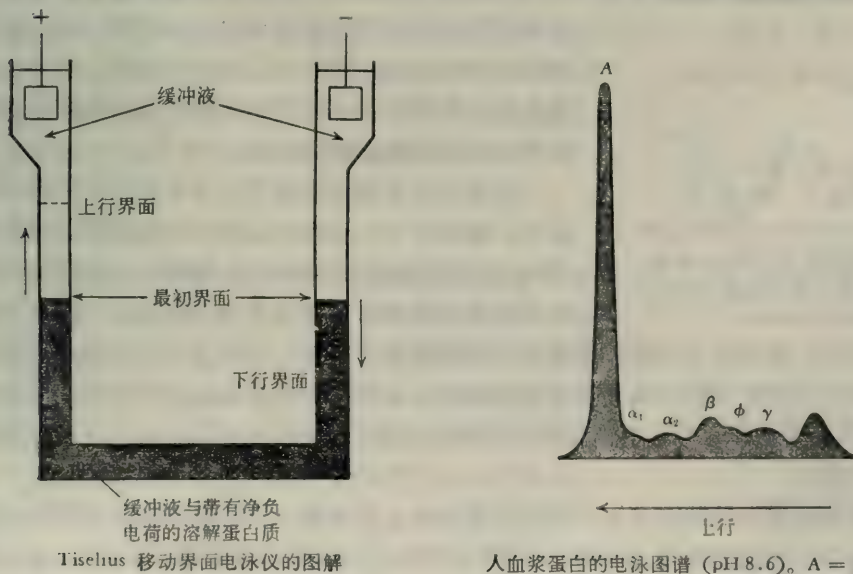
为分离和分析蛋白质的混合物, 现有两种广泛应用的普通方法——电泳与离子交换层析, 它们直接利用了蛋白质的酸-碱特性。

### 电泳法

有许多不同形式的电泳(又称为离子电泳), 它们对分析和分离蛋白质混合物很有用。在二十世纪三十年代, 瑞典 Tiselius 首先发展了自由或移动界面电泳, 这是所有现代电泳方法的雏型。在电场中一个分子的迁移率  $\mu$  (厘米<sup>2</sup>/伏特·秒), 可以用迁移速度  $v$  (厘米/秒) 对电场强度  $E$  (伏特/厘米) 的比值表示:

$$\mu = \frac{v}{E}$$

像氯化物这样的小离子, 其  $\mu$  值在 4 和  $9 \times 10^{-4}$  厘米<sup>2</sup>/伏特/秒之间 (25°C); 而蛋白



人血浆蛋白的电泳图谱 (pH 8.6)。A = 血清清蛋白;  
 $\phi$  = 纤维蛋白原;  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$  和  $\gamma$  是各种球蛋白 [重绘  
 自 R. Alberty, *J. Chem. Educ.*, 25: 619 (1948)]

图 7-9 自由电泳

质的 $\mu$ 值则大约为 $0.1-1.0 \times 10^{-4}$ 厘米<sup>2</sup>/伏特/秒。因此,在电场中蛋白质的迁移要比小离子如 $\text{Na}^+$ 或 $\text{Cl}^-$ 慢得多。这单纯是由于它们的电荷与质量之比很小。在自由电泳,先将蛋白质混合物的缓冲液放入一U形观察管内,再于蛋白质溶液上加盖一层纯缓冲液(图7-9)。将U形管浸入一杜绝振动的恒温浴中,继在两电极之间产生电场。此时带负电荷的蛋白质将朝阳极移动,而带正电荷的蛋白质则移往阴极。为了要得到混合物中所有蛋白质的完全图谱,通常可这样选择pH,即使大多数或全部蛋白质将带有同样电荷,但其迁移率各异。当带负电荷的蛋白质分子朝阳极移动时,它们会由蛋白质溶液迁移到不含蛋白质的缓冲液区内,从而形成一个前沿或界面。因为蛋白质分子的折射率与纯缓冲液的不同,所以在该界面上溶液的折射率就会急剧改变。若沿着U形电泳管进行折射率变化的光学测量,即可产生电泳图谱(称为暗线照相图谱),能表示出混合物中大多数蛋白质的迁移方向和相对移速。在图7-9所示的这种图谱,它里面的每一个谱峰相当于一种特异蛋白质移动界面的位置(它并非代表蛋白质浓度的峰)。如果在几种不同的pH值测定某一蛋白质的电泳迁移率,就可外推出该蛋白质的等电pH值。实际上,一种蛋白质的滴定曲线就是大致测定它那随pH而变动的电泳迁移率。多年来,移动界面电泳是定量分析复杂的蛋白质混合物(如血浆中的那些蛋白质)的最有价值的方法。

由于各种形式的区带电泳操作更趋简便,具有更强的分辨力,并且所需样品较少,它们已大大取代了自由电泳法。在区带电泳法,要求将蛋白质水溶液固定到一种固体基质或支持物中,而后者是一种水化的多孔物质,具有机械韧性,还能消除对流和振动的干扰。用得最广的支持物是滤纸或醋酸纤维素条,它们属于惰性较强的物质,不与正在迁移的蛋白质相互作用或不阻滞蛋白质移动。让电泳过程持续进行,直到大多数蛋白质组分被分离成散在的区带为止,所以取名为区带电泳。采用蛋白质染色剂,即可观测各个区带中蛋白质的位置和数量。而染色的密度又与蛋白质的量成正比,这可用一台扫描光密度计加以测定(图7-10)。区带电泳的分辨率已较自由电泳显著提高。在医院化验室里常用此法测定血浆中大多数蛋白质的含量。

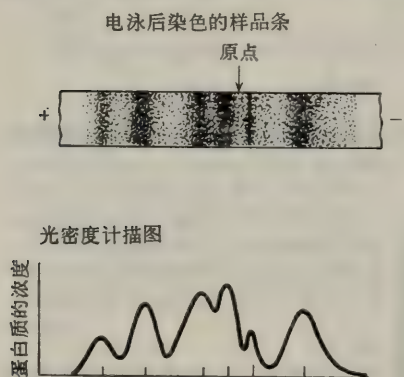


图7-10 醋酸纤维素条上的区带电泳。染色后,将样品条扫描,即绘成上图所示的蛋白质谱峰图。

当支持物或基质能像用于分子排阻层析的物质那样,按照分子大小对蛋白质分子起妨碍或排阻作用时,就可能达到更高的电泳分辨率。这种形式的区带电泳可根据电荷和分子大小两者来分离蛋白质混合物。为此目的,通常选用马铃薯淀粉和聚丙烯酰胺的凝胶。与以上概述的简式自由电泳或区带电泳所见到的大约5或6条区带相比较,这种电泳技术能把血浆的蛋白质组分分成15条或更多条区带。可以将聚丙烯酰胺凝胶电泳的规模按比例放大,以分离较大量的已纯化蛋白质。

区带电泳还有另一种改进方法,叫做盘状电泳。这是在一种阻滞性凝胶支持物中对待检的蛋白质混合物施加电场,而凝胶支持物又被分隔成孔径不同和pH值不同(缓冲调节而成)的两段。蛋白质混合物从孔隙多的凝胶向孔隙少的凝胶里迁移,这一过程伴有pH的变化。因此,每种蛋白质可被浓缩成一条极狭的界线分明的区带,从而产生了比在



连续缓冲系统中所能达到的更高的分辨率。因为采用了不连续缓冲系统，加以蛋白质区带呈圆盘状外观(图 7-11)，故称这一形式的区带电泳为盘状电泳 (disc electrophoresis, 不是 disk~)。

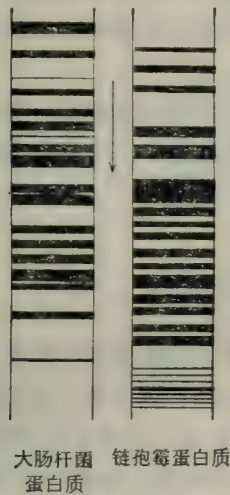


图 7-11 盘状电泳后，将凝胶染色，可显示蛋白质的各个区带。[重绘自 K. Linderstrom-Lang, and S. O. Nielsen, in M. Bier (ed.), *Electrophoresis*, p. 139, 1967]

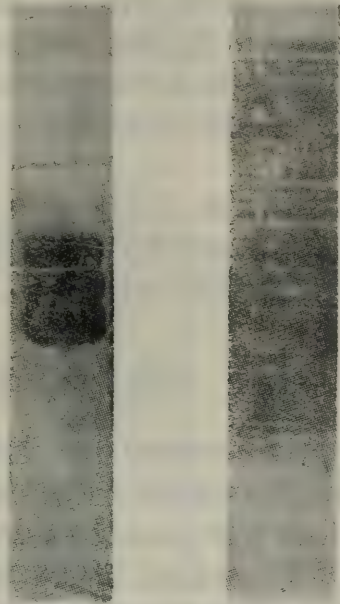


图 7-12 采用电聚焦从响尾蛇蛇毒中分离晶状 L-氨基酸氧化酶的同功酶(不同的分子形式)。盘状凝胶电泳(左图)只将该同功酶分成三条区带，而电聚焦(右图)则可分辨出该酶的 18 种不同分子形式。[引自 M. B. Hayes, and D. Wellner, *J. Biol. Chem.*, **244**: 6636 (1969)]

瑞典 Svensson 发明的等电聚焦或电聚焦，或许是最有创见和最有效的分离蛋白质的电泳方法。这是在先已形成一 pH 梯度的凝胶支持物中对蛋白质混合物施加电场。每种蛋白质将朝向 pH 值等于其等电 pH 的那部分 pH 梯度迁移，并在该处“聚焦”，形成一条清晰的固定区带(图 7-12)。等电聚焦的效力是卓越的。它可将人血浆蛋白质分离成 40 条或更多条区带。等电聚焦可作为一种分析工具投入常规使用，但也能用于大规模制备蛋白质纯品。

### 离子交换层析

利用蛋白质的酸-碱行为作为分离基础的第二种常用方法，是离子交换层析。此法也有许多改进。五十年代期间, Sober 和 Peterson 在美国首先将一些基本原理成功地应用于蛋白质混合物的分离；根据这些相同的原理，已能在离子交换树脂柱上分离和分析氨基酸与肽的混合物。为蛋白质层析最常用的物质是人工合成的纤维素衍生物。二乙基氨乙基纤维素(略写为 DEAE-纤维素)在 pH 7.0 时含有带正电荷的基团，所以它是一种阴离子交换剂(图 7-13)。在中性 pH 值，羧甲基纤维素(略写为 CM-纤维素)则含有带负电荷

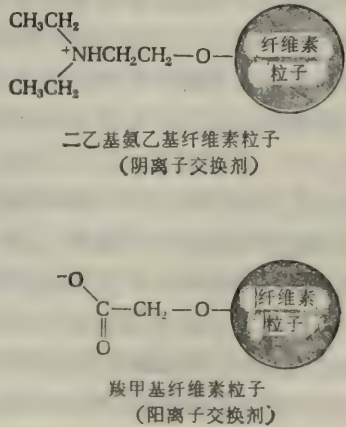


图 7-13 供蛋白质层析用的离子交换物质。每一个纤维素粒子含有大量离子交换基团，它们以共价键和纤维素的羟基相连。

的基团,故属于一种阳离子交换剂。使一系列 pH 递减的缓冲液或一系列离子强度递增的盐溶液通过 DEAE-纤维素柱,由于它们具有使带负电荷的蛋白质降低结合的作用,这样就可将蛋白质混合物分离,其各个组分相继地从柱上洗脱下来。当层析时,洗脱液的组成也逐渐而连续地变化,这过程称为梯度洗脱。为此目的所用的梯度,可能与洗脱液的容积成线性关系;或者设计以不同比例将液体混合,使该梯度按某些其他关系而变动。将洗脱物分成小部分收集起来,其中所含的蛋白质浓度则可利用它在紫外区的吸光能力进行光学测定。

此法的一项重要改进,是已经把离子交换同分子排阻原理结合应用。当根据分子大小和电荷两者来分离蛋白质混合物时,广泛采用了分子排阻物质——交联葡聚糖的二乙基氨基乙基衍生物(即 DEAE-交联葡聚糖)。

## 用选择性吸附法分离蛋白质

有一些分散得很细的较惰性材料,它们具有与粒子大小相关的极大的表面。如以这种材料装柱,蛋白质就能被吸附其上,并可使之从柱上选择地洗脱下来。它们包括非极性物质(如木炭)和极性物质(如硅胶或氧化铝)。关于使蛋白质与这种吸附剂结合的力量,尚未阐明其确切本质,但范德瓦耳斯力和疏水的相互作用力可能支配着非极性吸附剂;而离子吸引力和(或)氢键则是极性吸附剂表现的主要力量。

提纯蛋白质时用得最广和最有效的吸附剂,或许是一种晶形磷酸钙——羟磷灰石,即和骨骼中所含矿物质是同样的。有人推测,蛋白质分子中带负电荷的基团与羟磷灰石晶格里的  $\text{Ca}^{2+}$  离子相结合。用磷酸盐缓冲液可将蛋白质从羟磷灰石柱上洗脱下来。

## 根据配体特异性进行分离:亲和层析

通过亲和层析,常常只用一步就能从一个非常复杂的混合物中分离出某些蛋白质,并获得高纯度制品。此法是根据某些蛋白质的一项生物学性质而设计的,即它们具有同被称为配体的另外的分子进行特异性非共价结合的性能。例如,有些酶可借助非共价键力极紧密地与其特异性辅酶结合。为了用亲和层析将这样一种酶同其他蛋白质分离,可经由适当的化学反应使其特异性辅酶和多孔性装柱材料(如多糖——琼脂糖)的大水化粒子表面上的一个功能基发生共价连接。另一方面,这些材料却能让蛋白质分子自由通过(图 7-14)。当把含有待分离酶的蛋白质混合物加入这样的柱子后,酶分子就能紧密而特异地与被固定的配体分子结合,从而粘附到配体衍生的琼脂糖粒子上,而所有其他蛋白质由于缺乏同特殊配体分子发生特异结合的位点,则可在柱中通过。同理,我们也可以利用酶的一种底物或竞争性抑制剂作为衍生到装柱材料上的特异性配体。因此,本法将决定于蛋白质对其特定配体的生物亲和力。通常再用含有游离配体分子的溶液上柱,就能将以上述方式同柱中粒子特异结合的蛋白质洗脱下来。

亲和层析不仅可用来分离酶类,而且也用来分离细胞膜中与特异性激素结合的受体分子。例如,先使胰岛素分子与装柱材料呈共价连接,再用它进行亲和层析,这样就能分离出有些动物细胞质膜的胰岛素受体蛋白,并达到高度纯化。



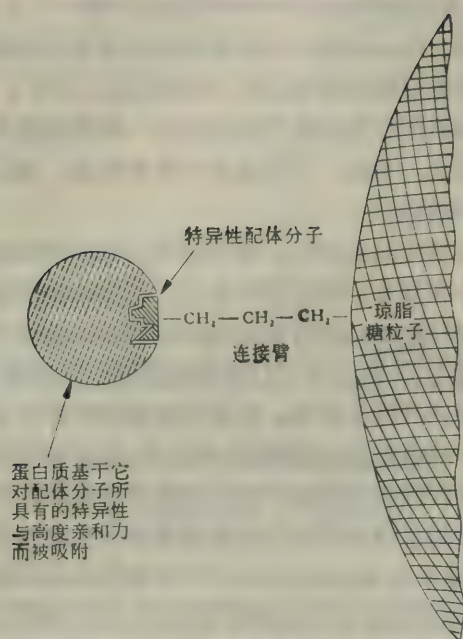


图 7-14 亲和层析的原理

## 蛋白质的提取和纯制

由于存在着大量不同的蛋白质,其生物活性极不相同,在各种机体的同系蛋白质之间又表现出化学差异,这就使得蛋白质的提取、纯制和鉴定成为所有生化研究中的关键问题。现有一千多种酶至少已被部分提纯,其中 200 种或更多种已制成纯结晶形式。还有几百种除了酶以外的蛋白质也已高纯度地分离出来。

早期分离蛋白质的方法多凭经验操作,少慢而费力。但自从改用目前有效的新方法(有些已如上述)以来,蛋白质的分离已变成了一种精巧的工艺。目前还没有只须经单一的操作或一组操作就能使任何一种蛋白质得以分离的步骤,但是对任何蛋白质而言,却可以选择序列的分离步骤以获得高纯度和高产量的制品。通常的要求是增加所需蛋白质的单位重量的纯度或生物活性,而除尽无活性或不需要的蛋白质,同时使产量达到最高水平。

首先,要求有一种特异而灵敏的方法,可以区别与定量测定待分离的特种蛋白质。如果它是一种酶,则需要一套能观测其催化活性的定量分析法。如该蛋白质是一种激素,采取适宜的生物鉴定法必定有效。假如该蛋白质含有一特殊的化学组分(例如像铜这样的微量金属),就可利用分析此组分的灵敏方法。

也有必要通过某实验步骤,使蛋白质以可溶形式从完整细胞或组织结构中释出,又不致丧失其活性。通常将动物组织机械捣碎或制成匀浆以破坏细胞膜,并释出细胞内容物,然后鉴定此内容物中所需的蛋白质含量。对细菌、酵母和许多植物细胞,必须施加更剧烈的处理以破坏其强韧的细胞壁,如声辐射、加砂研磨、在高压压榨机中捣成碎片等。有时用某些酶处理可引起细胞壁松垮或溶解。

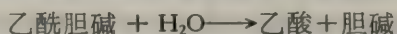
其次,惯常总要确定待查蛋白质究竟位于亚细胞层的哪一个主要细胞器(如胞核、线粒体或胞浆的可溶性部分等)中。采用差离心法分离细胞的细胞器,就可以完成此任务。若发现蛋白质存于一种主要的细胞部分内,利用该部分作为下一阶段纯化的起点,则能达到很大程度的提纯。如果所需要的蛋白质刚巧和一种膜或膜性细胞器相结合,那就必须将它以可溶形式抽提出来。为此,可加水进行简单抽提,继以机械或声处理使膜裂解,或者采用去污剂使膜结构解聚。

一旦所需要的蛋白质以可溶形式制获,就可应用本章中早已叙述的那些分级分离方法把它从混杂的蛋白质中分离开来。通过直接鉴定,便能确定所需要的蛋白质出现在哪一部分,以及它是否已被选择地浓缩,此时其比活性应增高。由于开始的细胞或组织抽提物可能含有几百种不同的蛋白质,所以为了从待提纯的蛋白质中除去大量其他的蛋白质,要使某蛋白质纯化,则须要进行许多步骤。在选用实验程序时可采取各种处理办法。

在分离程序中可先采用等电沉淀、盐析的分级分离、或溶剂沉淀等步骤。每一步分级分离都要测定其浓缩因素和所需蛋白质的产量。这些早先采用的步骤分辨力不很强,故一般要继之以层析。为了根据各自分子的大小和电荷多少来获得富含所需蛋白质的部分,常采用分子排阻层析和离子交换层析,两者的次序孰先孰后不论。亲和层析是一种极有效的方法,当可能使用时应将它放在其他种层析之后,或代替其他的层析。有时作为纯化的最后一步,常可小规模地使蛋白质通过某种形式的区带电泳、盘状电泳或等电聚焦,这样就可以将蛋白质从残留的杂质中高分辨率地分离。

如在一序列的这种纯化步骤之后,被提纯蛋白质的总产量达到相当高的水平,则常可能将蛋白质结晶出来。想只用一步操作就分别达到盐析或等电沉淀所要求的盐浓度或pH值,毕竟太慢了。另一种方法是将这个步骤颠倒,即先进行蛋白质的盐析,再充分稀释令其重新溶解,最后将溶液静置使蒸发而失水。然而结晶并不一定是完全纯化的标志,因为蛋白质晶体也常含有污染杂质。在上述这些步骤中,自始至终都必须用适当的缓冲液小心控制pH,并维持温度于最适水平。大多数蛋白质的最适温度接近0℃。

表7-3列举的资料来源于最近发表的实验方法——从电鳗(*Electrophorus electricus*)的带电组织分离乙酰胆碱酯酶。该酶可催化下列反应:



当底物乙酰胆碱被水解时,有乙酸生成。故测定酸度的增加(pH值的降低),即可定量分析酶的活性。每一酶部分的比活性,以每分钟每毫克蛋白质中被水解的乙酰胆碱微克分子数表示(参阅有关标准酶单位的讨论)。在每步纯化作用,比活性都增高,最初组织匀浆的比活性仅为16.7微克分子/毫克,而最终产物的比活性则已高达8,330微克分子/毫克。同时,每一步后,回收的酶活性均有所损失;实验结束时,回收只及开始时酶活性的12%。如果考虑到涉及的步骤之多,那么这还不算是非常低的产量。

为了说明亲和层析的高效力,表7-4记载了使用这种层析法从起始原料将酶提纯时乙酰胆碱酯酶的比活性和产量。这种操作只须通过一步,就能生成一种比活性显著较表7-3所用的操作序列为高的产物,而且产量也高得多。如将特异性配体连接到装柱材料上,就能选择地同乙酰胆碱酯酶分子结合。关于这些配体的结构,详见图7-15。该配体是乙酰胆碱酯酶的特异性极高的竞争性抑制剂,它的结构很像天然底物,但不能被酶裂解。



表 7-3 用标准程序纯化乙酰胆碱酯酶<sup>†</sup>

操 作 步 骤	比活性(微克分子/分钟/毫克)	产 量 (%)
新鲜组织匀浆	16.7	
抽提和硫酸铵沉淀	520	100
DEAE-纤维素	2,330	52
浓缩和透析	2,420	50
交联葡聚糖 G-200	4,170	43
Cellex-P (一种阳离子交换剂)	6,830	25
DEAE-纤维素	7,910	16
DEAE-交联葡聚糖	8,330	12

<sup>†</sup> 资料引自 T.L. Rosenberry, H.W. Chang, 和 Chen, Y.Y.: “用亲和层析纯化乙酰胆碱酯酶, 并确定其活性位点的化学计量法”, *J. Biol. Chem.*, **247**: 1555—1565 (1972)。文献著者的原始资料, 已根据标准酶单位重加演算。

表 7-4 用亲和层析纯化乙酰胆碱酯酶<sup>†</sup>

步 骤	比活性(微克分子/分钟/毫克)	产 量 (%)
硫酸铵沉淀 (见表 7-3)	470	(100)
亲和层析 (见图7-15)	9,750	70

<sup>†</sup> 参阅表 7-3 的附注。

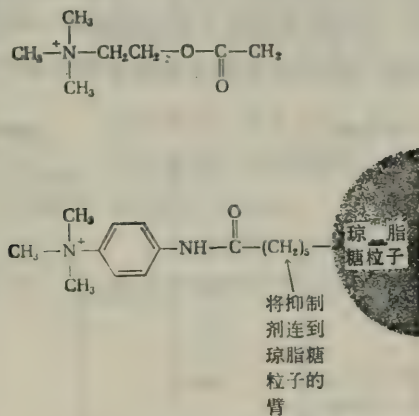


图 7-15 乙酰胆碱酯酶的亲和层析

上图: 正常底物——乙酰胆碱的结构;

下图: 乙酰胆碱酯酶的抑制剂, 以共价键接往琼脂糖粒子。左边为同正常底物相似的部分。

## 蛋白质分子的鉴定

当以高度纯品形式分离出一种已知蛋白质后, 还必须确定其均一性。为此, 以前常采用自由电泳和超离心机的沉降分析, 但这些耗费大且较不灵敏的方法已大多为一些较简易的方法所取代, 如分子排阻层析、聚丙烯酰胺凝胶电泳和等电聚焦等, 这些方法具有很强的分辨力, 并很易检出小分子蛋白质杂质的存在。

一旦确定了蛋白质的均一性, 就可通过一系列途径进行鉴定, 以明确各点: (1) 其分子量是多少; (2) 它究竟含有单条还是多条多肽链; (3) 多肽链的分子量; (4) 它们的氨

基酸组成, 以及 (5) 它们的氨基酸排列顺序。我们已经讨论了怎样去确定氨基酸的组成和排列顺序。在这里, 我们将简述通常用来测定球状蛋白分子量和亚基组成的各种方法原理。

### 从化学组成测定最小分子量

由于每分子已知蛋白质必然至少含有一分子辅基, 或者至少含有其组成氨基酸中的任一个残基, 故含有这样一个残基的蛋白质的质量 (其单位为道尔顿) 即等于最小分子量。例如, 肌红蛋白含有 0.335% 的铁, 其最小分子量可计算如下:

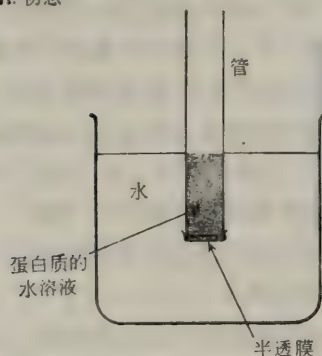
$$\text{最小分子量} = \frac{\text{铁的原子量}}{\text{铁}\%} \times 100 = \frac{55.8}{0.335} \times 100 = 16,700$$

真实分子量是最分子量的  $n$  倍, 此处  $n$  为每分子的铁原子数。在肌红蛋白, 由于  $n = 1$ , 故其真实分子量为 16,700。血红蛋白也含有铁, 但它每一分子有 4 个铁原子。因此,  $n = 4$ , 其真实分子量是按铁含量算得的最小分子量乘以 4。假如, 用作计算根据的残基或成分具有一个小  $n$  值, 则这样的计算是最准确的。

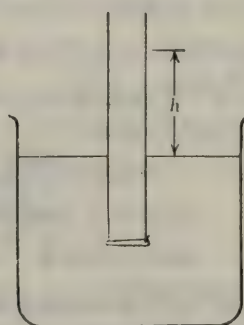
### 从渗透压的观测来测定分子量

当用半透膜使蛋白质溶液与纯水隔开时, 水分子就会越过半透膜向含有溶质的那侧移动, 这一过程称为渗透作用。它反映了水分子移动的这样一种趋势, 即它无论朝哪一方向移动, 都将使其热力学活动在它能进入的整个系统中到处都达到均一。而渗透压则是

A. 初态



B. 终态



C. 渗透压

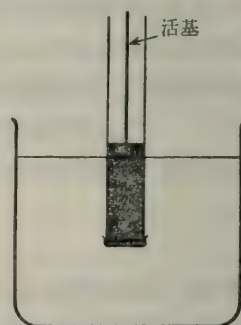


图 7-16 渗透作用和渗透压。在 B 图, 水已移动到蛋白质溶液中。平衡时, 蛋白质液柱的静压  $h$  恰能和水的渗透流动抗衡。渗透压 (C) 等于高差为  $h$  的静压。

一种为了与此渗透流动相抗衡而必须施加的力量 (图 7-16)。渗透压是溶液的依数性之一; 它随着每单位容积中溶质粒子的数目而变动, 但与溶质的分子本性和其形状无关。根据对已知浓度的蛋白质溶液的渗透压观测, 该蛋白质的分子量就可由下列关系测算出来:

$$M = \frac{c}{\pi} RT$$

上式中  $M$  为分子量,  $c$  为浓度 (克/升),  $R$  为气体常数 (0.082 升-大气压/克分子/ $K^*$ ),

\*  $K$  表示开氏温标。——译者注



$T$  为绝对温度(开氏温标),  $\pi$  是用大气压表示的渗透压。如以另一方式表示, 这样的关系指出, 将一种理想的未解离溶质溶于一理想溶剂中配成的 1M 溶液, 于  $0^{\circ}\text{C}$  产生 22.4 个大气压的渗透压。但是, 这种关系实际上只适用于极稀的溶液。通常要对溶质测定好几个浓度的渗透压, 再外推到蛋白质浓度为零时的渗透压。渗透压法在理论上具有很大优越性, 例如它无须了解蛋白质的形状。然而由于渗透压决定于溶液中的分子数, 一个不能透过半透膜的小质量分子将如大质量分子那样发挥相同的作用。因此, 低分子量的杂质极易给此法带来误差, 现在已很少用它了。

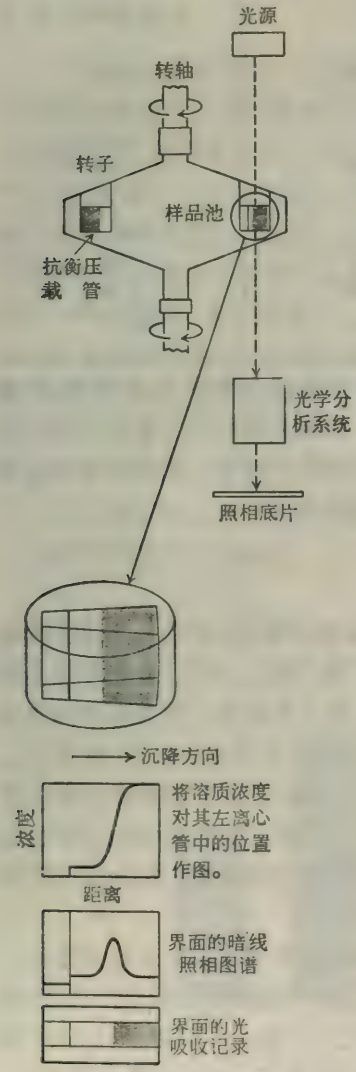
### 用沉降分析法测定分子量

Svedberg 于 1925 年发明的超离心机能产生超过重力 250,000 倍的离心力场。扩散力可以正常地维持蛋白质分子均匀分散在溶液中(见下节), 上述这样的高速离心力场则能

对抗扩散力而使蛋白质分子从溶液中沉降出来。用来观测蛋白质分子量的沉降测定法有三种类型, 即沉降速度法、沉降平衡法和接近平衡法。

首先, 我们将讨论沉降速度法。假如施加于溶液中蛋白质分子的离心力大大超过了相反的扩散力, 它们将会从溶剂的表面(弯月面)沉降下来, 让纯溶剂留盖其上, 形成了一个明显的界面。在沿离心管的不同位置上进行折射指数的光学测定, 即可观察此界面往离心管下方移动的速度(图 7-17)。当转子正在旋转时, 于离心的各时间间隔进行照相测定。离心机的传动系统要设计成恒速, 而且无振动。

当蛋白质的沉降界面以恒速移动时, 离心力恰好与溶剂的摩擦阻力相抗衡。蛋白质的沉降系数  $s$  可用下列



含有三种沉降蛋白质的混合物的暗线照相图谱, 每个谱峰表示一个界面的位置。

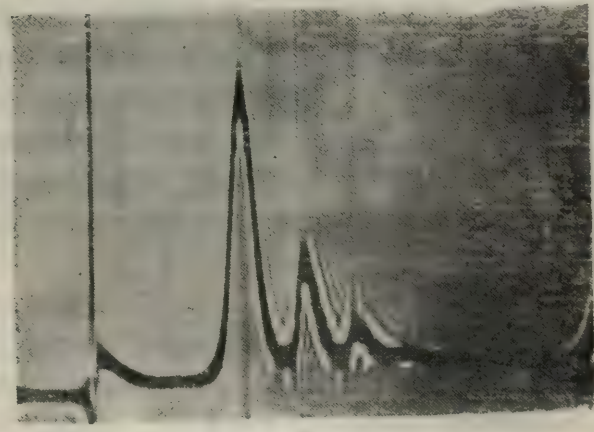


图 7-17 超离心机的原理, 说明当样品发生沉降时如何进行光学测定。

公式求得:

$$s = \frac{dx/dt}{\omega^2 x}$$

此处  $x$  是界面离旋转中心的距离(厘米),  $t$  为时间(秒),  $\omega$  为角速(弧度/秒)。蛋白质的沉降系数(以  $s_{20,w}$  表示, 这里规定温度为  $20^\circ\text{C}$ , 介质为水)范围在  $1 \times 10^{-13}$  秒与  $200 \times 10^{-13}$  秒之间(表 7-5)。我们将  $1 \times 10^{-13}$  秒的沉降系数称为一个 Svedberg 单位, 或简称为一个 Svedberg (S)。因此, 沉降系数  $8 \times 10^{-13}$  秒可用 8 S 表示。

表 7-5 某些蛋白质的物理常数

蛋 白 质	分 子 量	扩散系数	沉降系数
		( $D_{20,w} \times 10^7 \text{s}^{-1}$ )	(S)
细胞色素 c(牛心)	13,370	11.4	1.71
肌红蛋白(马心)	16,900	11.3	2.04
糜蛋白酶原(牛胰)	23,240	9.5	2.54
$\beta$ -乳球蛋白(山羊奶)	37,100	7.48	2.85
血清清蛋白(人)	68,500	6.1	4.6
血红蛋白(人)	64,500	6.9	4.46
醛缩酶	149,100	4.63	7.35
过氧化氢酶(马肝)	221,600	4.3	11.2
脲酶(刀豆)	482,700	3.46	18.6
纤维蛋白原(人)	339,700	1.98	7.63
肌球蛋白(鳕鱼)	524,800	1.10	6.43
烟草斑纹病毒	40,590,000	0.46	198

虽然沉降系数随分子量而增大, 但由于它也受溶剂的摩擦阻力和蛋白质形状的影响, 故同分子量并不成比例。然而加上另外一些资料, 一种蛋白质的分子量  $M$  仍可以用 Svedberg 方程式从沉降系数算出。此方程式是使离心力与相反的摩擦力相等时推导出来的。当沉降速率恒定时, 即有以下情况存在。Svedberg 方程式如下:

$$M = \frac{RTs}{D(1 - \bar{v}\rho)}$$

此处  $R$  为气体常数 ( $8.31 \times 10^7$  尔格/克分子/K),  $T$  为绝对温度(开氏),  $s$  为沉降系数,  $\bar{v}$  为蛋白质的微分比容,  $\rho$  为溶剂的密度, 而  $D$  则为扩散系数。当把 1.0 克干溶质加至无限大容积的溶剂中时, 其容积的增加值即为微分比容; 绝大多数蛋白质在水中的微分比容约为  $0.74$  厘米<sup>3</sup>/克。按照下述实验测得蛋白质的扩散系数, 引用这些数值, 就可以从以上方程式计算蛋白质的分子量。为求得最准确的结果, 必须用几种不同的蛋白质浓度来测定沉降系数  $s$  值和扩散系数  $D$  值, 并将其外推到无限稀释度。沉降速度的测定也能作为一种蛋白质的纯度状态和某种蛋白质混合物的组成提供有价值的情报, 因为不同的蛋白质将以不同速度沉降。(图 7-17)

用沉降平衡法测定分子量, 具有两个胜过沉降速度法的重要优点。它不须要知道扩散系数或蛋白质分子的形状。采用本法时, 可使超离心机以比较慢的速度转动, 只须恰好引起此系统达到平衡状态, 即蛋白质的沉降速度正好被相反的扩散力所平衡。当达到平衡时, 在表面的弯月面处不存在有纯溶剂区, 而朝离心管下方形成了一个蛋白质分子梯度, 离心管底层的蛋白质浓度约比上层高两倍。将蛋白质的浓度作为离旋转中心的距离的函



数加以测定,即可从下列方程式得出计算分子量的数据:

$$M = \frac{2RT \ln(c_2/c_1)}{\omega^2(1 - \bar{v}\rho)(x_2^2 - x_1^2)}$$

此处  $R$  和  $T$  的含义同惯常一样。在离心管隔旋转中心距离为  $x_1$  和  $x_2$  的两点上,其蛋白质浓度各为  $c_1$  和  $c_2$ ;  $\omega$  是角速度;  $\rho$  为溶剂密度,而  $\bar{v}$  则是蛋白质的微分比容。虽然沉降平衡法是最准确的沉降法,但它可能需要离心几天才会达到平衡。改用只装有很短的蛋白质液柱(1—2 毫米)的离心管,可部分解决这个困难。另外,本法所用蛋白质还必须非常纯净和均一。

接近平衡法代表一种折衷措施,它舍弃了平衡法的某些准确性,以便能快速测定分子量。在接近平衡法,通过一系列调整,使转速大致达到平衡速度,如此 1—2 小时以上。每次在靠近管底处测定蛋白质的浓度。根据这些即可外推出分子量。

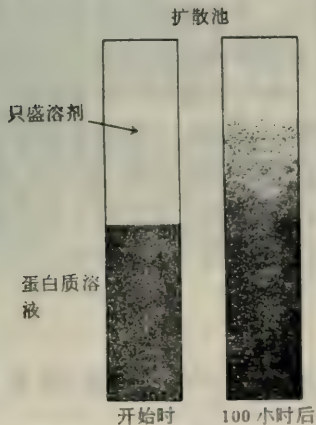
### 扩散与扩散系数

用沉降速度法测定一种蛋白质的分子量要求事先知道其扩散系数。由于扩散具有广泛的生物学意义,对扩散和扩散系数作一扼要讨论颇有必要。在一个处于平衡状态的蛋白质溶液中,虽然蛋白质分子总在进行不断的热力学运动,但整个溶液的溶质分布在统计学上是均匀的。若已经形成了蛋白质的浓度梯度,例如小心将纯水注加于一种蛋白质的水溶液上使成两层,蛋白质分子将会从下层的高浓度区朝上层的低浓度区移动。待建立平衡时,蛋白质分子在整个系统中都均匀地任意分布着。由浓度梯度引起的溶质分子的这样一种净移动,称为扩散。

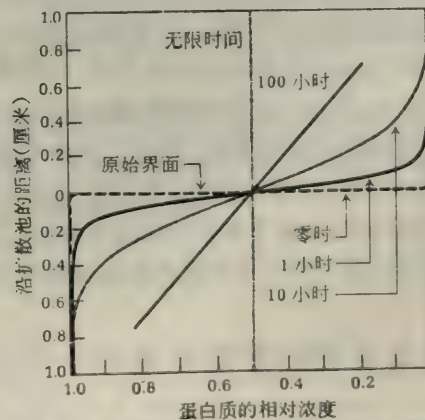
扩散速度可由 Fick 的扩散第一定律求得: 溶质  $ds$  在时间  $dt$  内扩散越过面积  $A$  的数量,与那一点上的浓度梯度  $dc/dx$  成正比:

$$\frac{ds}{dt} = -DA \frac{dc}{dx}$$

此比例常数  $D$  为扩散系数,其定义为: 当浓度梯度等于 1 时,溶质每秒钟扩散越过 1.0 厘米<sup>2</sup> 的表面积的数量。由于扩散是往低浓度的方向移动,故上式的符号为负。扩散



实验开始时和 100 小时后蛋白质在扩散池内的分布情况



图解表示在不同的时间间隔扩散池里蛋白质的浓度

图 7-18 蛋白质的扩散

系数随着分子的大小和形状以及溶剂粘度带来的摩擦阻力而变化。在球形大分子,其扩散系数与分子量的立方根成反比。

先将纯溶剂加盖到浓度已知的蛋白质溶液上,再测定蛋白质分子的界面向上迁移的速度,即可观测其扩散系数。在扩散池内的某一特殊点上,蛋白质浓度随时间而变化,对这变化可进行光学追踪(图 7-18)。蛋白质的扩散系数随分子量的增大而变小(表 7-5)。然而我们将注意到,血清清蛋白的形状与  $\beta$ -乳球蛋白虽相同,但它的分子量比后者大两倍,而扩散系数却只比后者小 23%。这些结果同扩散系数与分子量的立方根成反比这一事实相符。溶剂的摩擦阻力对抗了扩散,而前者又是粒子半径的一个极敏感的函数。因此,单凭扩散系数还不是测定蛋白质分子量的一种有效方法。但若结合沉降率测定,对球形蛋白质就能获得十分准确的数值。

扩散是所有细胞运转活动中的一个基本过程。现在认为,各种代谢物与酶的扩散速度和扩散路程,使活细胞及其细胞器的代谢物质在大小和容积方面受到物理限制。

### 用光散射法测定分子量

在暗室里,当一束光线通过一蛋白质溶液时,因为光线被蛋白质分子散射,我们可以看见光径。这叫做丁铎尔效应。从入射光的波长、散射光的强度、溶剂和溶质的折射率,以及溶质的浓度,就能计算蛋白质的分子量。由于能即时完成测定并随时记录,本法可用来研究分子量的迅速变化,如蛋白质解离或聚合时所发生的改变。尚无其他测定分子量的方法可以完成这样连续的测定;然而外源性尘粒却会造成很大的误差,必须仔细过滤以清除之。

### 用分子排阻层析法测定分子量

我们已经知道,采用分子排阻层析,可以根据分子量进行蛋白质混合物的分类。这个简易方法,不需要复杂的设备,却能异常准确地测定蛋白质的分子量(图 7-5)。分子排阻层析柱并非测定一种未知蛋白质的真分子量,而是测定其 Stokes 半径。我们可为此半径下一最简单的定义,即它是一个完全未水化的小球的半径,而该小球与待测的未知蛋白质通过层析柱的速度相同。若未知的与标志的蛋白质都是球形,本法就会直接测出分子量。

分子排阻层析还具有另一个独特的优点,即甚至在非常复杂的混合物中也能测出待检蛋白质的 Stokes 半径或近似分子量,只要蛋白质具有一种可加测定的特异生物学活性或性质。例如,虽然一种粗的细胞抽提物可能含有几百种不同的酶,可是只要简单地将此抽提物通过交联葡聚糖滤柱,再确定其洗脱液中酶催化活性的谱峰位置,那么无须进行分离,就常可测出抽提物中单一形式的酶的近似分子量。其他蛋白质的存在是无关紧要的,因为每种蛋白质将互不干扰地通过滤柱,其移速决定于各自的 Stokes 半径。分子排阻层析柱对测定蛋白质分子的缔合与解离也极为有用。

## 亚基数目和分子量的测定: 十二烷基硫酸钠 (SDS)-凝胶电泳

许多蛋白质都是低聚物,并且含有一条以上的多肽链。借助于一种变革的区带电泳——称为 SDS-凝胶电泳的方法,可使低聚体蛋白质被解离成它的亚基,并能测定各亚



基的分子量。本法也能用来测定单链蛋白质的分子量。用去垢剂十二烷基硫酸钠(SDS)处理纯品蛋白质时,它能把蛋白质解离成亚基,并使每条多肽链完全伸展,形成细长的棒状 SDS-多肽复合物。在此复合物中,一层 SDS 分子以这样的方式覆盖着多肽链,即其烃链同多肽链之间有紧密的疏水性缔合,而去垢剂的带电荷硫酸根就暴露到水介质中。该类复合物具有恒定的 SDS/蛋白质比值(按重量计约为 1.4:1),只是质量不一。若在含有 SDS 的分子筛凝胶中使 SDS 处理过的单链蛋白质电泳,按照分子排阻原理,主要从 SDS-多肽粒子的质量就可测定其迁移率。电场仅仅为分子筛滤作用提供了推动力。为了校正某一凝胶系统,必须用分子量已知的标志蛋白质作对比电泳。

根据蛋白质分子的分子量、形状和构象进行鉴定时,还有许多其他专门的步骤可加利用,对此,本章所附参考文献有所介绍。

## 摘 要

根据后列各指标的差异,能将蛋白质相互分离:(1)分子大小;(2)溶解度性质;(3)电荷;(4)吸附行为,以及(5)蛋白质对一特异性配体所表现的生物亲和力。在分子大小的基础上分离蛋白质,可采用不同形式的密度-梯度离心法和分子排阻层析来实现。也可以根据差示溶解度来分离蛋白质,而这又取决于 pH、离子强度、介质的介电常数和温度等四个变数。盐析和等电沉淀特别有用。根据电荷来分离蛋白质则视其酸-碱特性而定,后者的变动反映了多肽链中可电离的 R 基团的状态。每种蛋白质都有一个特定的等电 pH,在此 pH 值时,它将不会在电场内移动。高于等电 pH 时,蛋白质带净负电荷;而低于等电 pH 则带净正电荷。

根据蛋白质在一个电场内移动的相对速度,既可在水溶液中用自由电泳法将它们的混合物分离,也可在凝胶或半固体支持物中用区带电泳进行分离。盘状电泳和等电聚焦提供了特别高的分辨力。也可以用离子交换层析来分离蛋白质。

蛋白质的提纯将涉及:(1)特异鉴定方法的有效性;(2)建立一种方法,使处于溶解状态或与某种亚细胞的细胞器相缔合状态的蛋白质从细胞内释出;(3)如属必要,应将蛋白质自细胞器中抽提出来,以及(4)采用一序列的各种分级分离步骤,直到物理化学指标(如凝胶电泳或等电聚焦)证明已获得的蛋白质比活性达到了最大和恒定水平,而且实现了均一性。

从有关蛋白质化学组成的知识,从渗透压、观测、沉降速度或平衡的观测,或者采用凝胶排阻层析,都可以测定某种蛋白质的分子量。我们也能分离蛋白质的亚基多肽链,并在去垢剂如十二烷基硫酸钠存在下,用凝胶电泳测定其分子量。

## 参 考 文 献

### 书籍

- Bailey, J. L.: *Techniques in Protein Chemistry*, 2nd ed., Elsevier, New York, 1967.  
Cohn, E. J., and J. T. Edsall: *Proteins, Amino Acids, and Peptides*, Reinhold, New York, 1941; reprinted 1958. The development of the modern theory of proteins as electrolytes.  
Edsall, J. T., and J. Wyman: *Biophysical Chemistry*, vol. 1, Academic, New York, 1958. Detailed treatment of acid-base and electrolyte properties of amino acids, peptides, and proteins.  
Haschemeyer, R. H., and A. E. V. Haschemeyer: *Proteins: A Guide to Study by Physical and Chemical*

- Methods*, Wiley, New York, 1973. A valuable short book. Provides up-to-date references in all aspects of protein separation and characterization.
- Jakobi, W. (ed.): *Enzyme Purification and Related Techniques*, vol. 22 of *Methods in Enzymology*, Academic, New York, 1971.
- Morris, C. J. O. R., and P. Morris: *Separation Methods in Biochemistry*, Pitman, London, 1963.
- Schachman, H. K.: *Ultracentrifugation in Biochemistry*, Academic, New York, 1959. Classic treatise.
- Tanford, C.: *Physical Chemistry of Macromolecules*, Wiley, New York, 1961. The authoritative textbook in this field.
- Van Holde, K. E.: *Physical Biochemistry*, Prentice-Hall, Englewood Cliffs, N.J., 1971. An excellent, clearly written short treatment of fundamentals.
- Work, T. S., and E. Work: *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 1, North-Holland, London, 1969. Gel electrophoresis and immunoelectrophoresis are described.

## 论文

- Ackers, G. K.: "Analytical Gel Chromatography of Proteins," *Adv. Protein Chem.*, 24: 343 (1970).
- Andersen, N. G.: "Preparative Particle Separation in Density Gradients," *Quart. Rev. Biophys.*, 1: 217 (1968).
- Cuatrecasas, P., and C. B. Anfinsen: "Affinity Chromatography," *Ann. Rev. Biochem.*, 40: 259—278 (1971).
- Weber, K., and M. Osborn: "The Reliability of Molecular Weight Determinations by Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis," *J. Biol. Chem.*, 244: 4406 (1969).
- Wellner, D.: "Electrofocusing in Gels," *Anal. Chem.*, 43: 597 (1971).

## 习 题

1. 一纯品血红素蛋白含铁 0.426%，试计算其最小分子量。
2. 按重量计，一种纯酶含有 1.65% 亮氨酸和 2.48% 异亮氨酸，试计算该酶的最小分子量。
3. 计算一个提纯的等电蛋白质的分子量，其 1% 溶液的渗透压在 0°C 时为 46 毫米水柱（假设它是一个理想溶液）。
4. 按 20°C 水校正时，一种蛋白质的微分比容为 0.707 厘米<sup>3</sup>/克，扩散系数为  $13.1 \times 10^{-7}$  厘米<sup>2</sup>/秒。其沉降系数为 2.05S。20°C 时水的密度等于 0.998 克/厘米<sup>3</sup>。试用 Svedberg 方程式计算其分子量。
5. 有一溶液每毫升含有 1 毫克的肌球蛋白和  $10^{14}$  个胶乳微粒。将已知体积的此溶液放在一个栅条上干燥，并置于电子显微镜下观察，在一个标准视野中可见有 122 个蛋白质分子和 10 个乳胶微粒。试计算肌球蛋白的分子量。
6. 在所示各 pH 的电场中，下列各蛋白质将朝哪个方向迁移[即移向阳极 (A)，还是移向阴极 (C)，或是静止不动 (0)]？(可参用表 7-1 的资料)。
  - (a) 卵清蛋白在 pH 5.0 时
  - (b)  $\beta$ -乳球蛋白在 pH 5.0 和 pH 7.0 时
  - (c) 糜蛋白酶原在 pH 5.0、9.5 和 11 时
7. 在何种 pH 值进行电泳时将下列蛋白质混合物的分离最为有效？(可参用表 7-1 的资料)
  - (a) 血清清蛋白和血红蛋白
  - (b) 肌红蛋白和糜蛋白酶原
  - (c) 卵清蛋白、血清清蛋白和脲酶
8. 当通过一根蛋白质分级分离范围在 5,000—400,000 的分子排阻层析柱时，试预报后列蛋白质从柱上洗脱的次序：肌红蛋白、过氧化氢酶、细胞色素 c、肌球蛋白、糜蛋白酶原以及血清清蛋白（参阅表 7-5 的分子量值）。
9. 当通过第 8 题所述的分子排阻层析柱时，若细胞色素 c、 $\beta$ -乳球蛋白、一种未知蛋白质和血红蛋白等的洗脱容积分别为 118、58、37 与 24 毫升，问此未知蛋白质的分子量是多少？假设所有蛋白质均为球形，并且其分子量位于层析柱的蛋白质分级分离范围之内。

[卢义钦译 方暨岚校]



## 第八章 酶：动力学与抑制

酶是催化生物学反应的一类特殊蛋白质。由于它们具有很高的特异性和很强的催化能力,远比人工制造的催化剂要高,它们是已知的最值得注意的生物分子之一。

生物化学的历史大部分是酶的研究史。在 1877 年以前未曾使用酶(“在酵母中”)这一名称,但在更早时期,就认为生物催化剂参与了糖发酵生成酒精的过程(因而较早的名称为“酵素”)。1835 年 Berzelius 首先提出化学催化的一般理论,其中包括现今通称酶的一个例子,即麦芽的淀粉糖化酶,并指出此酶催化淀粉水解比硫酸的催化效率高。

虽然巴斯德认识到发酵是由酶类催化的,但他认为(1860 年)这些酶类与酵母细胞的结构和生命是不可分割地联系在一起。因此,当 1897 年 Eduard Buchner 成功地从酵母细胞中提取出能催化酒精发酵的酶类时,便成为酶研究史上的一个划时代的重大事件。这一成就清楚地论证了在主要放能代谢途径中起催化作用的这些重要的酶类,可以不依赖于细胞的结构而起作用。然而,直到若干年以后才首次将酶分离为纯结晶型。这项工作是在 1926 年由 Sumner 完成,他从刀豆提取液中分离出脲酶。Sumner 提出此结晶是由蛋白质所组成的证据,并作出与当时流行的看法完全相反的结论,认为酶类是蛋白质。但是他的观点并未立即被大家所接受,直到 1930—1936 年, Northrop 结晶了胃蛋白酶、胰蛋白酶和糜蛋白酶(图 8-1),这时酶类的本质是蛋白质的看法才被牢固地建立起来。今天已知将近 2,000 种不同的酶类。许多酶已被分离为纯的均一形式,其中至少有 200 种已被结晶。

虽然已对大多数与细胞基本代谢活动有关的酶类作了鉴定,但还有许多重要的问题尚待解决,包括酶合成的遗传控制、酶活性调节的分子机理,以及在发育和分化过程中某些酶类多种形式的功用。尤其是在分子关系上,我们仍然不知道酶类催化化学反应为什么具有这样的效率、精密度和特异性。

在本章和下一章中,我们打算对今天已知的大量不同的酶类进行编目和叙述,而是就大多数酶类所共有的性质和特征加以研讨。参与各种代谢循环的一些特殊酶类,将在后续各章中更为详尽地加以讨论。



图 8-1 牛糜蛋白酶结晶

### 酶类的命名与分类

许多酶的命名是在底物(即被酶作用的分子)的名称上加一个字尾-ase。例如:脲酶

(urease) 催化尿素 (urea) 水解生成氨和  $\text{CO}_2$ ; 精氨酸酶 (arginase) 催化精氨酸 (arginine) 水解生成鸟氨酸和尿素; 磷酸酶 (phosphatase) 催化磷酸酯 (phosphate) 类的水解。然而这种命名法不一定能用于所有的酶类, 因而许多酶类的命名未指明催化性质, 例如: 胃蛋白酶、胰蛋白酶和过氧化氢酶。由于这个原故, 并由于新发现酶类的数目迅速地增加, 故

表 8-1 酶类的国际分类法 (类名、编号和所催化的反应类型)

### 1. 氧化-还原酶类(催化氧化-还原反应)

1.1 作用于  $\text{>CH-OH}$

1.2 作用于  $\text{>C=O}$

1.3 作用于  $\text{>C=CH-}$

1.4 作用于  $\text{>CH-NH}_2$

1.5 作用于  $\text{>CH-NH-}$

1.6 作用于  $\text{NADH; NADPH}$

### 2. 转移酶类(催化功能基团的转移)

2.1 转移一碳基团

2.2 转移醛基或酮基

2.3 转移酰基

2.4 转移糖基

2.7 转移磷酸基

2.8 转移含硫基团

### 3. 水解酶类(催化水解反应)

3.1 水解酯类

3.2 水解糖苷键

3.4 水解肽键

3.5 水解其他  $\text{C-N}$  键

3.6 水解酸酐键

### 4. 裂合酶类(催化双键的加成反应)

4.1 作用于  $\text{>C=C<}$

4.2 作用于  $\text{>C=O}$

4.3 作用于  $\text{>C=N-}$

### 5. 异构酶类(催化异构化反应)

5.1 消旋酶类

### 6. 连接酶类(催化与 $\text{ATP}$ 分解偶联形成各种键的反应)

6.1 形成  $\text{C-O}$  键

6.2 形成  $\text{C-S}$  键

6.3 形成  $\text{C-N}$  键

6.4 形成  $\text{C-C}$  键

采用了国际酶学委员会推荐的酶类系统分类法。这个新系统是根据酶所催化的反应类型, 把酶主要分为六大类和若干亚类 (表 8-1)。给每一种酶指定一个推荐名称、系统名称



和分类编号,推荐名称通常简短,适用于日常使用;系统名称则鉴别酶类所催化的反应;分类编号则用于须要准确而不含糊地鉴定酶类时,如用于国际研究杂志、文摘和索引中。这里以一种催化下列反应的酶作为例子来加以说明:



通常应用的此酶的推荐名称为肌酸激酶,而根据催化的反应,其系统名称为 ATP: 肌酸磷酸转移酶。它的分类编号是 EC 2.7.3.2., EC 代表酶学委员会,第一位数字(2)为类名(转移酶类),第二位数字(7)为亚类(磷酸转移酶类),第三位数字(3)为次亚类(以含氮基团作为受体的磷酸转移酶类),第四位数字(2)表示肌酸激酶(参看表 8-1)。在本书中,除少数例外,我们是按酶的命名法(1973 年版)一书所列的表,采用酶类的推荐名称(见参考书)。

### 酶的辅助因子

某些酶类的活性仅由它们的蛋白质结构所决定,而另一些酶类还需要一种或更多种的非蛋白质组份,称为辅助因子。辅助因子可以是金属离子或者是称为辅酶的有机分子;有些酶类两者都需要。通常辅助因子耐热,而大多数酶蛋白质受热丧失活性。具有催化活性的酶-辅助因子复合物称为全酶。当除去辅助因子之后,剩余的蛋白质其本身无催化活性称为酶蛋白。

表 8-2 某些含有或需要金属离子作为辅助因子的酶类

<b>Zn<sup>2+</sup></b>	
	醇脱氢酶
	碳酸酐酶
	羧肽酶
<b>Mg<sup>2+</sup></b>	
	磷酸水解酶类
	磷酸转移酶类
<b>Mn<sup>2+</sup></b>	
	精氨酸酶
	磷酸转移酶类
<b>Fe<sup>2+</sup> 或 Fe<sup>3+</sup></b>	
	细胞色素类
	过氧化物酶
	过氧化氢酶
	铁氧还蛋白
<b>Cu<sup>2+</sup> (Cu<sup>+</sup>)</b>	
	酪氨酸酶
	细胞色素氧化酶
<b>K<sup>+</sup></b>	
	丙酮酸激酶(也需要 Mg <sup>2+</sup> )
<b>Na<sup>+</sup></b>	
	质膜 ATP 酶(也需要 K <sup>+</sup> 和 Mg <sup>2+</sup> )

表 8-2 列举了一些需要金属离子作为辅助因子的酶类。在这些酶类中,金属离子可

能起以下几种作用：(1)主要的催化中心；(2)一种桥梁基，通过形成一种配位复合物，将底物与酶结合在一起；或(3)作为一种使酶蛋白质的构型稳定于催化活性形式的物质。需要金属离子的酶类有时称为含金属酶类。某些含金属酶类中其金属组份单独就有催化活性，但酶蛋白质却能大大地增强这一能力，例如，含有铁卟啉的过氧化氢酶能催化过氧化氢迅速分解为水和氧。简单的铁盐也能催化这一反应，但其催化速度要低得多。

表 8-3 扼要列举了一些主要的辅酶以及它们所参与的酶促反应的类型。所列出的每种辅酶含有一分子某种维生素作为它们结构的一部分，维生素是一类微量的有机物质，对所有细胞的功能都是不可缺少的，某些种类的动物在饮食上也是需要的。这些维生素和它们的辅酶形式将在第十三章中讨论。通常辅酶在总的酶促反应中是作为转移功能基团、特殊原子或电子的中间载体而起作用。当辅酶非常牢固地结合在酶分子上时，通常称它为辅基，例如，乙酰辅酶 A 羧化酶的生物胞素 (biocytin) 基团，就是以共价形式结合在多肽链上。然而，有时辅酶仅与酶蛋白质疏松地结合，并在本质上作为酶的特异底物之一而起作用。

表 8-3 在基团转移反应中的辅酶

辅 酶	转移的实物
烟酰胺腺嘌呤二核苷酸	氢原子(电子)
烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸	氢原子(电子)
黄素单核苷酸	氢原子(电子)
黄素腺嘌呤二核苷酸	氢原子(电子)
辅酶 Q	氢原子(电子)
焦磷酸硫胺素	醛类
辅酶 A	酰基
硫辛酰胺	酰基
钴胺酰胺辅酶类	烷基
生物胞素	二氧化碳
磷酸吡哆醛	氨基
四氢叶酸辅酶类	甲基、亚甲基、甲酰基或亚胺甲基

## 化 学 动 力 学

我们在着手研讨酶对反应的催化作用之前，有必要概括性地介绍一下应用在测定和表示化学反应速率的某些关系的术语。化学反应可以根据最后起反应形成反应产物所必需的分子数目来分类。于是有单分子、双分子和三分子反应，在这些反应中分别有一个、两个或三个分子参与反应。

化学反应也可以在动力学的基础上用反应级数来分类，因而有零级、一级、二级和三级反应之分，决定于在一定条件下反应物浓度如何影响反应速率。

一级反应是指反应速率与一种反应物浓度严格地成正比反应(图 8-2)。最简单的例子是当反应 ( $A \rightarrow P$ ) 的速率与 A 浓度严格地成正比时，在任何时间  $t$  的反应速率可用一级反应速率方程式表示：

$$-\frac{d[A]}{dt} = k[A]$$



上式中  $[A]$  为反应物 A 的克分子浓度, 而  $-d[A]/dt$  为反应物 A 浓度减少的速率。比例常数  $k$  称为速率常数或反应比速。一级反应速率常数的单位是时间的倒数, 通常为秒<sup>-1</sup>。

这个方程式的积分形式对进行动力学的计算更加有用处,

$$\log \frac{[A_0]}{[A]} = \frac{kt}{2.303}$$

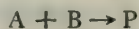
上式中  $[A_0]$  为反应物 A 在零时的浓度,  $[A]$  为反应物 A 在  $t$  时的浓度。

在一级反应中, 反应的半衰期 ( $t_{1/2}$ ) 可由简单推导而来的关系式得出:

$$t_{1/2} = \frac{0.693}{k}$$

在一级反应中, 半衰期与底物的最初浓度无关。

二级反应是指反应速率与两种反应物浓度的乘积成正比, 或与单一的反应物浓度的平方成正比的那些反应。最简单的例子是下面这种反应。



这个反应的速率可用  $-d[A]/dt$ 、 $-d[B]/dt$  或  $+d[P]/dt$  表示, 与反应物 A 和 B 浓度的乘积成正比, 可用二级反应速率方程式得出:

$$\frac{-d[A]}{dt} = k[A][B]$$

上式中的  $k$  是二级反应速率常数, 如果反应的形式为  $2A \rightarrow P$ , 而其反应速率与两个反应分子浓度的乘积成正比, 则二级反应速率方程式为:

$$\frac{-d[A]}{dt} = k[A][A] = k[A]^2$$

二级反应速率的单位为升/(浓度 × 时间), 或克分子浓度/秒。

二级反应速率方程式的积分形式为:

$$t = \frac{2.303}{k([A_0] - [B_0])} \log \frac{[B_0][A]}{[A_0][B]}$$

上式中  $[A_0]$  和  $[B_0]$  是反应物 A 和 B 的最初浓度,  $[A]$  和  $[B]$  是  $t$  时的浓度。

因为在二级反应中反应物的最初浓度是相等的, 所以, 反应的半衰期等于  $1/C_0k$ ,  $C_0$  是反应物的最初浓度,  $k$  是二级反应速率常数。

注意到这一点是重要的, 即像  $A + B \rightarrow P$  这样一个二级反应, 可能在某些情况下, 看来似乎是一级反应。例如: 如果反应物 B 浓度很高, 而反应物 A 浓度很低, 这个反应看来可能是一级反应, 因为它的反应速度几乎仅与一种反应物 (即反应物 A) 的浓度成正比。在这种情况下, 反应是一种表观的一级反应或假的一级反应。

三级反应比较罕见, 是指那些与三项反应物浓度的乘积成正比的反应。有些化学反应速率与任何反应物的浓度无关, 这些反应称为零级反应。许多催化反应就反应物而言是零级反应。当这种情况确是如此时, 反应速率取决于催化剂浓度或参加反应的各种分子浓度以外的某些因素。反应速率不一定是纯一级反应或纯二级反应, 常常为混合级的反应。

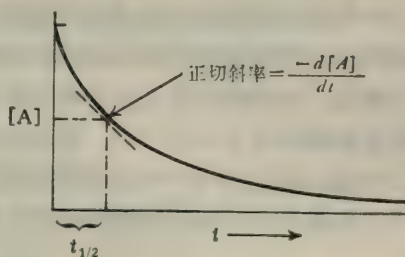


图 8-2 一级反应过程图  
半衰期 ( $t_{1/2}$ ) 是指最初的反应物被消耗一半时所需的时间。

## 活化自由能和催化剂的效应

一种化学反应如  $A \rightarrow P$  之所以能发生,是因为在任何瞬时,反应物 A 分子总体中的某一部分分子具有足够能量达到活化状态,称为过渡状态,在过渡状态时,一种化学键将产生或断裂,而形成产物 P 的这种可能性是很高的。这种过渡状态处在分离反应物与产物的能量屏障顶点上(图 8-3)。已知化学反应的速率与这种过渡状态物的浓度成正比。活化自由能  $\Delta G^\ddagger$  (符号  $\ddagger$  代表活化过程)是指在一定的温度下,能使 1 克分子物质的所有分子达到最高活化阈的过渡状态时所需要的能量。

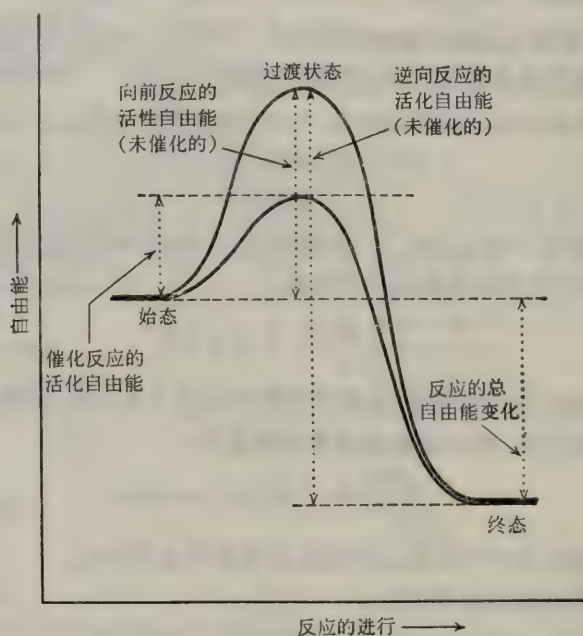


图 8-3 未催化与催化的化学反应能量图

加速化学反应速率一般有两条途径。升高温度,因为它能增加热运动和能量,使能够进入过渡状态的分子数增加,从而加速化学反应速率。在许多反应中,温度每上升  $10^\circ\text{C}$  时,反应速率约增加一倍。也可添加催化剂来加速化学反应速度。催化剂能短暂地与反应物结合形成一种过渡状态,而这种状态比未被催化反应的过渡状态具有较低的活化能。因此,催化剂是通过降低活化能来加速化学反应的(图 8-3)。当反应产物形成时,又生成游离的催化剂。表 8-4 表示在非催化条件和催化条件下过氧化氢分解的活化能。

表 8-4 在  $20^\circ\text{C}$  测得的过氧化氢分解的活化自由能  $\Delta G^\ddagger$ ; 过氧化氢酶使反应速率加速  $10^8$  倍以上

条 件	$\Delta G^\ddagger$ (千卡/克分子)
未催化的反应	18
用胶态铂催化的反应	13
用过氧化氢酶催化的反应	7



## 酶催化反应的动力学: Michaelis-Menten 方程式

化学反应动力学的一般原理能适用于酶催化的反应,但酶催化反应还表现出一种在非酶促反应中不常见到的显著特征,即可与底物饱和。从图 8-4 中,我们可以看出底物浓度对酶催化反应 ( $A \rightarrow P$ ) 速率的影响。

在低底物浓度时,最初反应速度  $v_0$  与底物浓度几乎成正比,因此,反应对底物而言近似于一级反应。然而当底物浓度增加时,最初反应速度下降,且不再与底物浓度成正比;在这一区域内反应为混合级。若再增加底物浓度,则反应速度本质上变得与底物浓度无关,并渐近于恒定的速度。在这一底物浓度范围内,就底物而言,反应本质上属于零级,而把酶说成是由它的底物所饱和。所有的酶类

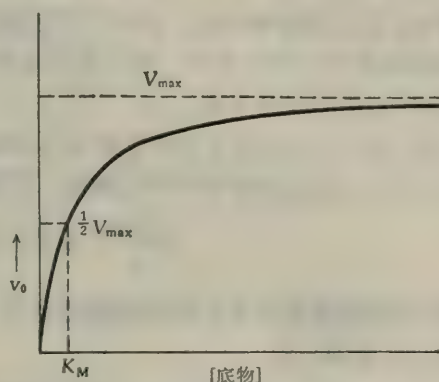
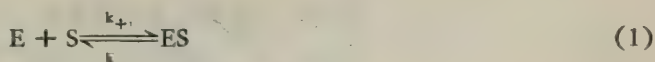


图 8-4 底物浓度对酶催化反应速率的影响

都表现出这种饱和作用,但就产生饱和效应所需底物浓度而论,酶类的变化很大。早期某些研究工作者,特别是 Brown 和 Henri,根据这种饱和效应而假定酶与底物可逆地起反应形成一种复合物,作为催化反应的一个必需的步骤。

1913 年由 Michaelis 和 Menten 发展了酶的作用和酶动力学的一般理论,晚后,由 Briggs 和 Haldane 加以引伸扩充。这种理论是酶动力学和酶抑制各个方面定量分析的基础,在仅有一种底物的简单情况下,这种理论得到最好的发展。Michaelis-Menten 理论假定酶 E 首先与底物 S 结合形成酶-底物复合物 ES; 然后此复合物在第二步反应中分解形成游离的酶和产物 P:



假定这个反应是可逆的,向前和逆向反应的速率常数分别用正号和负号表示。

现在我们推导 Michaelis-Menten 方程式,此方程式表示酶催化反应的最初速率、底物浓度与酶的某些特征之间的数学上的相互关系。Michaelis-Menten 方程式是单一底物的酶催化反应的速率方程式。在 Briggs 和 Haldane 的这个推导中,  $[E]$  代表游离的或未结合的酶浓度,  $[ES]$  代表酶-底物复合物浓度,  $[E_T]$  代表酶的总浓度(游离的与结合的形式之和)。  $[S]$  代表底物浓度,并假定它远远大于  $[E]$ , 因此在任何一定的时间内,与酶 E 结合的底物 S 的数量同底物 S 的总浓度相比可以忽略不计。

此推导的目的在于给酶催反应的初速  $v_0$  规定一个一般的表示法,假定酶催化反应分两步进行,如反应式 (1) 和 (2) 所示。根据反应式 (2),初速当然与酶-底物复合物 ES 的分解速率相等,我们可以把它写成一级反应速率方程式。

$$v_0 = k_+ [ES] \quad (3)$$

然而, 因为  $k_{+2}$  和  $[ES]$  都不能直接测定, 所以我们必须根据其他的变量找出  $v_0$  的别的表示法, 这个变量是较易测定的。为此, 我们首先写出从 E 和 S 形成 ES 的二级速率方程式 [参看反应式 (1)]:

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_{+1}([E_T] - [ES])[S] \quad (4)$$

上式中  $k_{+1}$  是二级速率常数。虽然也可以通过反应 (2) 的逆转从 E 和 P 形成 ES, 但这个逆反应的速率可以忽略不计, 因为我们考虑在向前方向反应刚刚开始时,  $[S]$  是非常高的, 而  $[P]$  为零或接近于零。

其次, 我们可以由两个反应之和写出 ES 分解的速率方程式; 首先, 反应生成产物(向前方向); 第二, 反应生成 E + S [方程式 (1) 的逆方向]。于是得出:

$$-\frac{d[ES]}{dt} = k_{-1}[ES] + k_{+2}[ES] \quad (5)$$

当 ES 的形成速率等于它的分解速率时, 即当这个体系进入稳态(在这种情况下, ES 浓度保持不变)时, 则

$$k_{+1}([E_T] - [ES])[S] = k_{-1}[ES] + k_{+2}[ES] \quad (6)$$

图 8-5 表示酶促反应的各参与者(底物浓度、酶浓度、ES 复合物浓度、产物浓度)的时间过程。

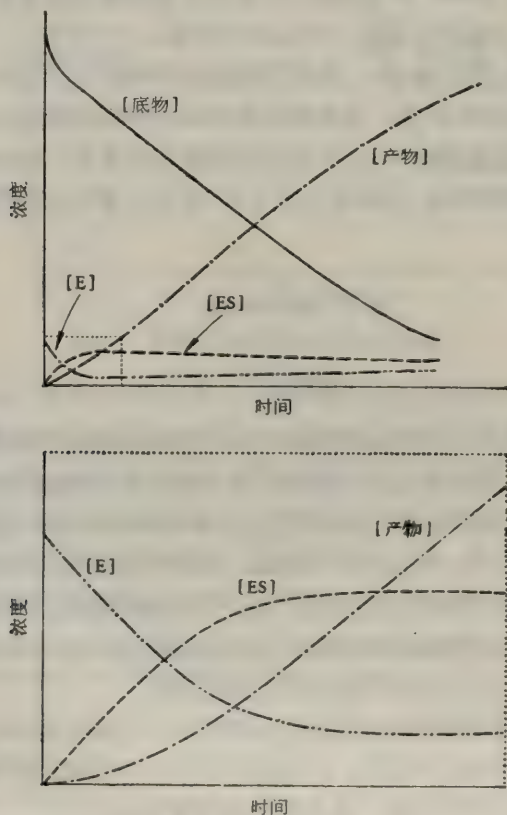


图 8-5 按典型酶的实际实验所得到的数据通过计算机解法 (computer solutions) 而得出的酶-底物复合物形成的时间过程和稳态的开始。将上图左下角虚线方框部分放大表示于下图。



将方程式(6)移项得:

$$\frac{[S]([E_T] - [ES])}{[ES]} = \frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}} = K_M \quad (7)$$

代替  $(k_{-1} + k_{+2})/k_{+1}$  项的概括常数  $K_M$  称为 Michaelis-Menten 常数。

从此方程式求解  $[ES]$ , 即得出 ES 复合物的稳态浓度:

$$[ES] = \frac{[E_T][S]}{K_M + [S]} \quad (8)$$

我们从上面已看出, 酶促反应的初速  $v_0$  为:

$$v_0 = k_{+2}[ES] \quad (3)$$

现在将方程式(8)中的  $[ES]$  值代入方程式(3)的  $[ES]$  项:

$$v_0 = k_{+2} \frac{[E_T][S]}{K_M + [S]} \quad (9)$$

当底物浓度高到使这个体系中所有的酶实质上都以 ES 复合物的形式存在时, 即当酶被底物饱和时, 便达到最大初速  $V_{max}$ ,

$$V_{max} = k_{+2}[E_T] \quad (10)$$

上式中  $[E_T]$  为酶的总浓度。现从方程式(9)解得的  $k_{+2}$  的值代入方程式(10)中, 则得:

$$v_0 = \frac{V_{max}[S]}{K_M + [S]} \quad (11)$$

此即 Michaelis-Menten 方程式, 是酶催化的一种底物反应的速率方程式。它通过 Michaelis-Menten 常数将初速、最大速度、最初底物浓度联系起来。注意到这一点是重要的, 即使 Michaelis-Menten 方程式中看来似乎没有酶浓度这一项, 但实际上它包括在  $V_{max}$  项内, 我们已经知道,  $V_{max}$  等于  $k_{+2}[E_T]$ 。

在特殊情况下, 当反应初速刚好为最大速度的一半时, 即当  $v_0 = \frac{1}{2} V_{max}$  时(图8-4),

从 Michaelis-Menten 方程式中得出一个重要的数的关系。

$$\frac{V_{max}}{2} = \frac{V_{max}[S]}{K_M + [S]}$$

若用  $V_{max}$  除上式, 即得:

$$\frac{1}{2} = \frac{[S]}{K_M + [S]}$$

移项, 则成为:

$$K_M + [S] = 2[S]$$

$$K_M = [S]$$

因此, 可以看出, 反应初速为最大速度的一半时 Michaelis-Menten 常数  $K_M$  等于底物浓度。一种底物反应的  $K_M$  单位为每升克分子, 它与酶浓度无关。

从一系列的简单实验, 即以不同的底物初浓度与固定的酶浓度作用, 测定反应初速, 便可得到任何已知酶的  $K_M$  近似值。以反应初速对底物初浓度作图, 从所得到的矩形双曲线图形中而得出  $K_M$  的近似值(图8-4)。在非常低的底物浓度时, 初速  $v_0$  几乎与  $[S]$  成正比; 即反应本质上表现为一级反应。在很高的底物浓度时, 反应速度接近于  $V_{max}$ , 反应本

质上为零级反应,即几乎与底物浓度无关。少数的酶类,如过氧化氢酶,看来似乎不能由底物所饱和;这是因为 ES 复合物分解形成产物的速度是如此之快,因而不易成为限速速度。

表 8-5 中列出了许多酶的  $K_M$  值。注意,  $K_M$  值不是一个固定的数值,而是随底物结构、pH 和温度而变化。对具有一种底物以上的酶类,每种底物各有一个特殊的  $K_M$ 。在细胞内的情况下,酶类不一定由它们的底物所饱和。我们回顾上面所讲过的,最大速度  $V_{max}$  等于  $k_{+2}[E_T]$ ,对一定酶浓度的不同的酶,  $V_{max}$  也有很大的变化。 $V_{max}$  也随底物的结构(表 8-6)、pH 和温度而变化。

表 8-5 某些酶类的  $K_M$  值

酶 和 底 物	$K_M$ , mM
过氧化氢酶	
$H_2O_2$	25
己糖激酶	
葡萄糖	0.15
果糖	1.5
糜蛋白酶	
N-苯甲酰酪氨酰胺	2.5
N-甲酰酪氨酰胺	12.0
N-乙酰酪氨酰胺	32
甘氨酸酪氨酰胺	122
碳酸酐酶	
$HCO_3^-$	9.0
谷氨酸脱氢酶	
谷氨酸	0.12
$\alpha$ -酮戊二酸	2.0
$NH_4^+$	57
氧化型 NAD	0.025
还原型 NAD	0.018
天冬氨酸氨基转移酶	
天冬氨酸	0.9
$\alpha$ -酮戊二酸	0.1
草酰乙酸	0.04
谷氨酸	4.0

表 8-6 底物结构对 D-氨基酸氧化酶  $V_{max}$  的影响  
(以 D-丙氨酸=100 的相对数据)

底 物	相对 $V_{max}$
D-酪氨酸	297
D-脯氨酸	231
D-甲硫氨酸	125
D-丙氨酸	100
D-缬氨酸	55
D-组氨酸	9.7
甘氨酸	0.0

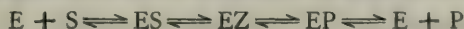


酶的 Michaelis-Menten 常数是一个重要有用的特征,它不仅对酶动力学的数学描述是重要的,而且对组织中酶活性定量测定和酶的提纯也是重要的。况且产生二分之一最大速度的底物浓度对某些酶调节机理的分析提供了一个有用的指标。最近医学研究中一个显著的例子,从另一角度说明  $k_M$  是有用的。通过静脉内注入天冬酰胺酶可以遏制动物和人类的某种白血病(一种白细胞异常增生的癌症),此酶催化下面的反应。



这一发现得到以下的结论,存在于血液中的天冬酰胺是恶性白细胞生长所必需的营养素;从静脉注入天冬酰胺酶引起天冬酰胺水解为天冬氨酸,便不能满足恶性白细胞对天冬酰胺的需要。在寻求适合于治疗白血病的天冬酰胺酶的来源时,得出一个困惑的发现,即并不是所有的天冬酰胺酶都能有效地遏制实验性的白血病。最后发现其原因是:从不同的动物、植物和细菌中得到的天冬酰胺酶,它们对天冬酰胺的  $K_M$  值有很大的差别。因为血液中天冬酰胺浓度很低,注入从其他种类动物得到的天冬酰胺酶,只有当它们的  $K_M$  低到足以迅速地水解存在于血液中低浓度的天冬酰胺时,才有治疗效果。

大多数酶类的动力学行为比我们刚才所讨论的简单的理想化的一种底物反应要复杂得多。首先,我们的公式是假定在一种底物反应中,只有一种酶-底物复合物,现在看来似乎许多一种底物反应可包含两个或三个中间复合物,像下面的顺序所示:



式中 EZ 是过渡状态复合物,而 EP 是酶-产物复合物。况且只有少数的酶促反应含有单一的底物;而大多数酶类有两个或更多个底物,并可能有两个或更多个产物。包括多种反应物和多种产物的酶促反应的动力学分析是复杂的;但是,Michaelis-Menten 方程式中的关系仍然是所有的酶促反应动力学分析的出发点。

## Michaelis 常数 $K_M$ 和底物常数 $K_S$

上面所列出的 Michaelis 常数是一个从实验测得的经运算确定的数值;即反应速度为最大速度一半时的底物浓度。在上面推导中所应用的理想化的情况下,  $K_M$  用下式表示:

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}} \quad (7)$$

但是在某些酶促反应中,与  $k_{+2}$  相比,  $k_{-1}$  是很大的,在这种情况下,速率常数  $k_{+2}$  变得很小,可忽略不计,方程式 (7) 简化为:

$$K_M \approx \frac{k_{-1}}{k_{+1}}$$

上式中  $K_M$  大致等于酶-底物复合物的离解常数  $K_S$ , 也称为底物常数:

$$K_S = \frac{[\text{E}][\text{S}]}{[\text{ES}]}$$

遗憾的是,常常把  $K_M$  和  $K_S$  错误地认为是同义的。其实,除非特别说明,与  $k_{-1}$  相比  $k_{+2}$  是很小的,就不应该把  $K_M$  看作是 ES 复合物的离解常数。

## Michaelis-Menten 方程式的变换

可以将 Michaelis-Menten 方程式的关系 [方程式 (11)] 经代数学上的变换成为在实验数据作图中更有用的其他形式。一种通常的变换形式是简单地将 Michaelis-Menten 方程式 (11) 两边取倒数而得来的:

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_M + [S]}{V_{\max}[S]}$$

经整理得:

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_M}{V_{\max}[S]} + \frac{[S]}{V_{\max}[S]}$$

简化为:

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_M}{V_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \quad (12)$$

方程式 (12) 是 Lineweaver-Burk 方程式。以  $1/v_0$  对  $1/[S]$  作图得一直线。直线的斜率为  $K_M/V_{\max}$ , 其在  $1/v_0$  轴上的截距为  $1/V_{\max}$  和在  $1/[S]$  轴上的截距为  $-1/K_M$  (图 8-6)。这种双倒数图有利于更精确的测出  $V_{\max}$ , 但如图 8-4 中所见, 以  $v_0$  对  $[S]$  的简单作图中, 在底物浓度无限大的情况下,  $V_{\max}$  只能被约计为有限值。我们将在后面看到这种双倒数图在酶的抑制方面也能得出有价值的知识。

Michaelis-Menten 方程式的另一种有用的变换形式是将方程 (12) 两边乘以  $V_{\max}$  而得来的, 经整理得:

$$v_0 = -K_M \frac{v_0}{[S]} + V_{\max}$$

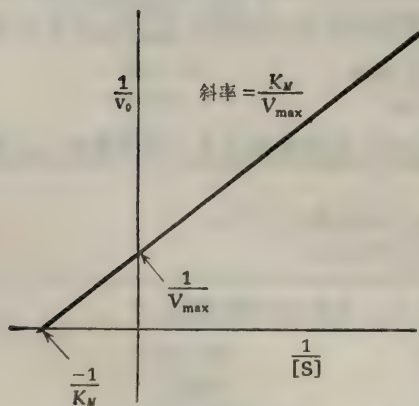


图 8-6 双倒数 (Lineweaver-Burk) 图

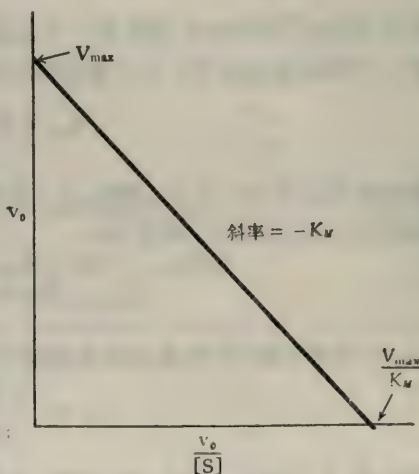


图 8-7 Eadie-Hofstee 图

以  $v_0$  对  $v_0/[S]$  作图, 称为 Eadie-Hofstee 图 (图 8-7), 它不仅以最简单的方式得出  $V_{\max}$  和  $K_M$ , 而且放大了对直线性的偏离, 这种偏离在双倒数图中可能是不明显的。



## pH 对酶活性的效应

大多数酶类有一个特殊的 pH 值,在这一 pH 下其活性最大;高于或低于这一 pH,活性降低。虽然,许多酶的 pH-活性图形是钟形,但它们在形式上有很大的变化(图 8-8)。任何已知酶的 pH-活性关系取决于酶与底物的酸碱行为,以及通常难以定量分析的许多其他因素。由于大多数酶类的  $K_M$  随 pH 而变化,所以 pH-活性图的形状通常随底物浓度而改变。如果在试验的所有 pH 值下,假如酶与底物保持饱和,这种曲线是最有意义的。在酶动力学的大多数研究中, pH 保持恒定于或接近于最适 pH。

一种酶的最适 pH 与其正常细胞内环境的 pH 不一定相同,细胞内环境的 pH 可能在其 pH-活性图形的上升或下降的斜度部分。这表明酶的 pH-活性关系可能是细胞内控制酶活性的一个因素。

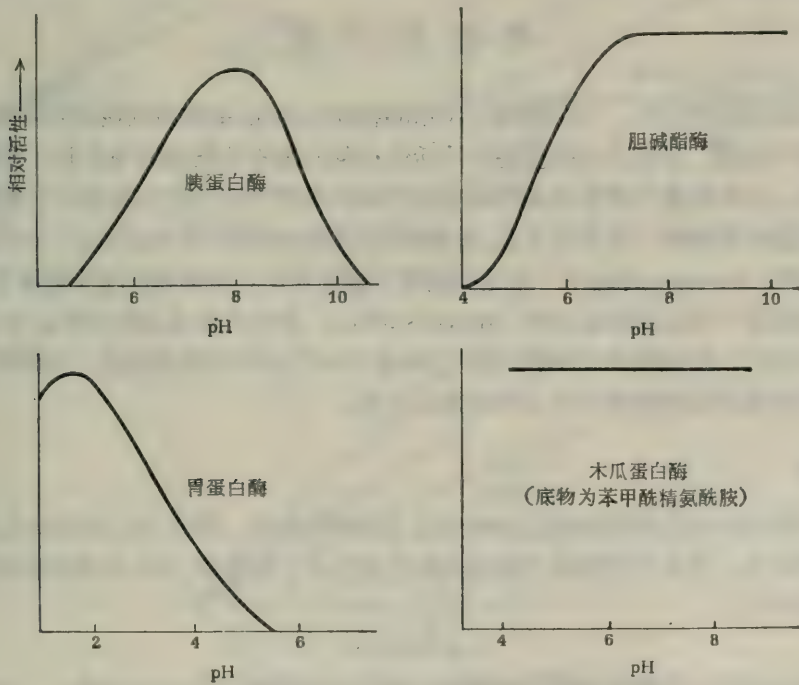


图 8-8 某些酶类的 pH-活性图

## 温度对酶促反应的效应

正如大多数化学反应那样,在一定温度范围内,酶所催化的反应速率通常随温度的增加而增加,在此温度范围内,酶是稳定的,并保持充分的活性。每当温度升高  $10^{\circ}\text{C}$  时,大多数酶促反应速率约增加一倍 ( $Q_{10} \approx 2$ )。然而各种酶的温度系数  $Q_{10}$  却有所差异,这取决于所催化反应的活化能,即进入过渡状态能阈的高度。(图 8-3)

虽然酶催化的反应常常表现有一个最适温度(图 8-9),用酶催化活性对温度的关系

作图,在这种图中得出的高峰处就是酶的最适温度,但因为酶类是蛋白质,当温度升高超

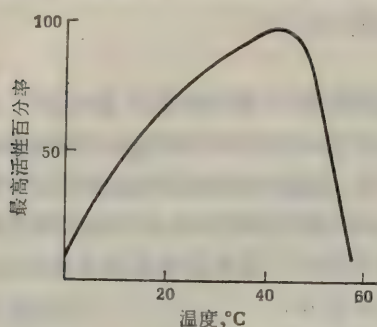


图 8-9 温度对酶活性的影响。酶类就其对热的稳定性而言是不同的,曲线的下降部分是由于热变性的作用。

出某一点时,便受热的作用而变性,成为无活性的酶。因此,表观的“最适”温度是两个过程作用的结果:(1)反应速率通常随温度而增加及(2)在临界温度以上,酶的热变性速率增加。在温度约 55—60°C 以上时,虽然大多数酶类是无活性的,然而,某些酶类在较高的温度时仍很稳定并保持催化活性,例如:生活于温泉的各种嗜热性细菌的酶类,当温度超过 85°C 时仍有活性。

有些酶类,如核糖核酸酶,加热便失去活性,但经冷却后,其活性迅速得到恢复,表明其伸展了的多肽链非常迅速地恢复到它们天然的构型。

## 酶 抑 制 作 用

从酶抑制剂的研究中,已在酶催化作用的机理和途径、酶类对底物的特异性、活性部位功能基团的性质,以及参与维持酶分子活性构象的某些功能基团等方面都得到了很有价值的知识。而且特殊代谢物对某些酶类的抑制在调节中间代谢方面是一个重要因素。

酶的可逆性抑制的三种主要类型,竞争性的(competitive)、无竞争性的(uncompetitive)和非竞争性的(noncompetitive),通过抑制剂对酶反应动力学影响的实验能够加以区别,而酶反应动力学又可以根据基本的 Michaelis-Menten 速率方程式进行分析。为了进行正确的动力学分析,抑制剂必须与酶或酶-底物复合物迅速而可逆地结合。与酶缓慢地和(或)不可逆地起反应的抑制剂将在别处加以讨论。

### 竞争性抑制

竞争性抑制的特点是抑制剂以这种方式与游离酶结合,即它与正常底物在活性部位竞争与酶的结合。竞争性抑制剂可逆地与酶反应形成一种类似于酶-底物复合物的酶-抑制剂复合物(EI):



这种抑制剂分子与酶结合后没有化学上的改变。按照 Michaelis-Menten 方程式的形式,可以把抑制剂常数  $K_i$  规定为酶-抑制剂复合物的离解常数:

$$K_i = \frac{[E][I]}{[EI]}$$

因此,抑制剂常数  $K_i$  与酶-底物复合物的离解常数  $K_s$  是相当的。

因为在固定抑制剂浓度下,增加底物浓度则抑制的百分数减少,故易于通过实验识别竞争性抑制。为了作定量的动力学分析,在抑制剂浓度不变的情况下,测定改变底物浓度  $[S]$  对初速  $v_0$  的影响。然后用不同浓度的抑制剂重复这个实验;常常进行几个系列的这种实验,而每一系列的实验是在不同浓度抑制剂的条件下进行的。然后以  $1/v_0$  对  $1/[S]$  作图,对抑制剂的每种浓度作图一张。这些图形得到一组特殊的直线,以共同的截距在



$1/v_0$  轴上相交(图 8-10)。因此,竞争性抑制剂的存在,使酶对底物的表观的  $K_M$  增加,即使酶需要一个较高的底物浓度才能达到它的最大速度。由于在  $1/[S]$  轴上的截距增加底物表观的  $K_M$  将比真实的  $K_M$  大。因未被抑制的反应其图形的斜率为  $K_M/V_{\max}$  (图 8-10; 表 8-7),而受到抑制反应的斜率为  $K_M/V_{\max}(1 + [I]/K_I)$ ,所以抑制反应的斜率增加  $1 + [I]/K_I$  因数。从这个关系中可以算出  $K_I$ 。另一方面竞争性抑制对  $V_{\max}$  没有特殊的影响,说明它不妨碍酶-底物复合物的分解速率。

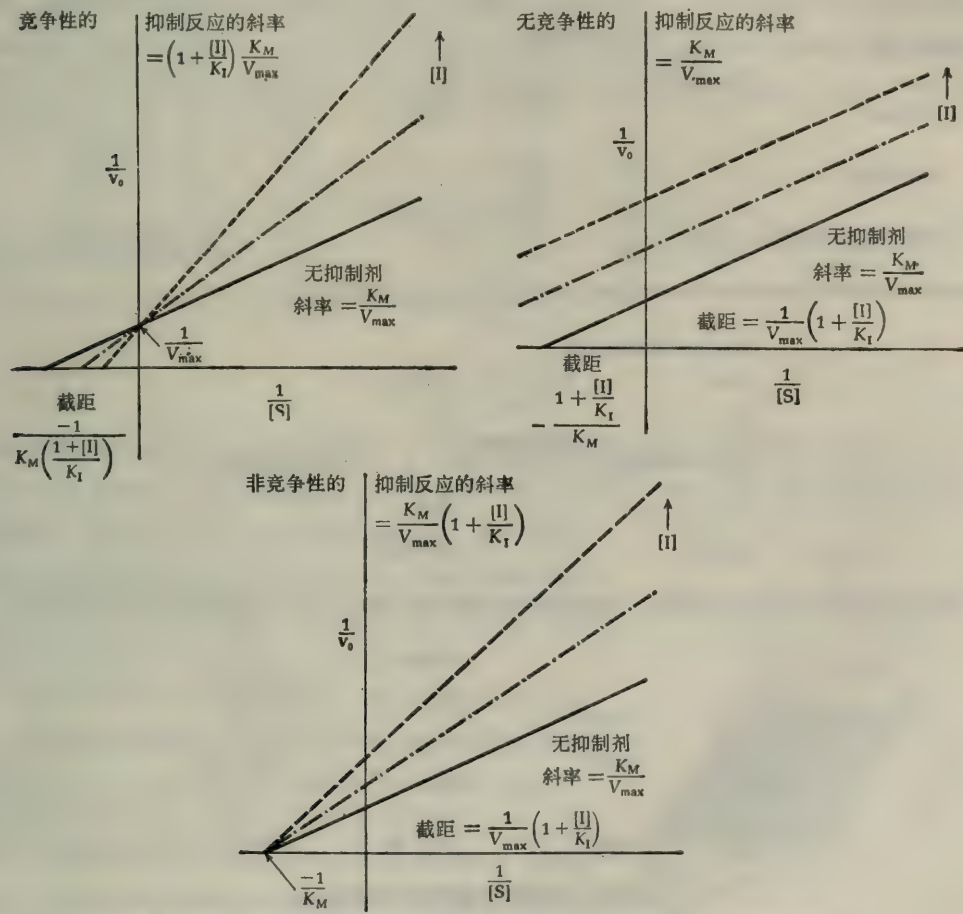


图 8-10 双倒数图表示酶的竞争性的、无竞争性的和非竞争性抑制的影响。

竞争性抑制的经典例子,是丙二酸和其他二羧酸的阴离子(图 8-11)对琥珀酸脱氢酶的抑制。琥珀酸脱氢酶是有关三羧环反应的一组酶类中的一个。琥珀酸脱氢酶催化两个氢原子从琥珀酸的两个亚甲基碳原子上脱下(氢原子受体的性质和这个讨论没有关系)。竞争性抑制剂丙二酸类似于琥珀酸,在 pH 7.0 时,有两个离子化的羧基,但不同之处是琥珀酸脱氢酶不能使丙二酸脱氢。如果加入足够量的丙二酸,使已知浓度琥珀酸的脱氢作用受到抑制,譬如说 50% 被抑制,若增加琥珀酸浓度将减少被丙二酸抑制的百分数。

除丙二酸外,某些其他二元酸的阴离子,假定其两阴离子基团之间具有适当距离,也可以作为琥珀酸脱氢酶的竞争性抑制剂,例如:从焦磷酸阴离子引出这样的结论,琥珀酸脱氢酶的催化部位有两个适当隔开的正电荷的基团,能吸引底物的两个带负电荷的羧基。

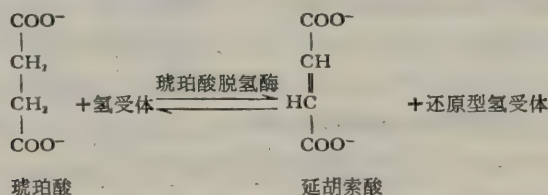
因此,酶的催化部位与底物结构显示互补的关系。

从竞争性抑制剂的分子结构与它对酶的亲和力(用抑制常数  $K_I$  表示)之间的关系,能够得到关于活性部位的结构和几何构型的有价值的知识。这是一条探测酶活性部位的重要途径。

表 8-7 抑制剂对 Lineweaver-Burk 图 ( $1/V_0$  与  $1/[S]$  的关系) 的影响

	斜 率	在纵坐标上的截距
无抑制剂	$\frac{K_M}{V_{max}}$	$\frac{1}{V_{max}}$
竞争性的	$\frac{K_M}{V_{max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)$	$\frac{1}{V_{max}}$
无竞争性的	$\frac{K_M}{V_{max}}$	$\frac{1}{V_{max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)$
非竞争性的(两者的 $K_I$ 相同)	$\frac{K_M}{V_{max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)$	$\frac{1}{V_{max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)$

琥珀酸脱氢酶的反应



琥珀酸脱氢酶的几种竞争性抑制剂。注意所有的抑制剂都有两个阴离子基团,其间的距离与琥珀酸的相似。

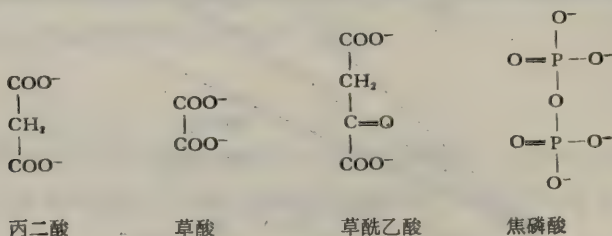
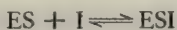


图 8-11 琥珀酸脱氢酶的竞争性抑制

### 无竞争性抑制

无竞争性抑制的命名不是非常恰当的,在这种抑制中,抑制剂不是与游离酶结合,而影响酶与其正常底物的反应;然而它却与酶-底物复合物结合生成一种无活性的酶-底物-抑制剂复合物,此复合物不能进一步起反应生成正常产物:



因此,抑制剂常数为:

$$K_I = \frac{[ES][I]}{[ESI]}$$

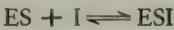
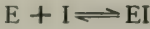
增加底物浓度不能使无竞争性抑制逆转。在固定的抑制剂浓度下,从  $1/v_0$  对  $1/[S]$



作图,最易识别无竞争性抑制。如图 8-10 和表 8-7 所示,典型的无竞争性抑制,当增加抑制剂浓度时,图中直线的斜率保持不变,但  $V_{\max}$  却减少了。无竞争性抑制在一种底物反应中是罕见的,但在两种底物反应中是常见的。

### 非竞争性抑制

非竞争性的抑制剂或者与游离酶结合,或者与酶-底物复合物结合,并妨碍这两者的作用。非竞争性抑制剂与酶结合的部位,并非酶的活性部位,而常使酶变形,因此不能以正常速度形成 ES 复合物,一旦 ES 复合物形成,又不能以正常速度分解形成产物。这些影响不能以增加底物浓度使之逆转。在非竞争性抑制中,酶与抑制剂反应生成两种无活性形式的复合物,即 EI 和 ESI。



两式的抑制剂常数分别为:

$$K_I^{EI} = \frac{[E][I]}{[EI]}$$

$$K_I^{ESI} = \frac{[ES][I]}{[ESI]}$$

这两个常数可以相等也可以不相等。在不同的固定的抑制剂浓度存在的情况下,从  $1/v_0$  对  $1/[S]$  的作图中,也非常容易识别非竞争性抑制(图 8-10; 表 8-7)。图中各直线的斜率是不同的,且在  $1/v_0$  轴上没有相同的截距。被抑制的酶与未被抑制的酶相比较,前者在  $1/v_0$  轴上的截距较大,这表明,由于抑制剂的作用而酶的  $V_{\max}$  降低了,而且不管底物浓度怎么高,  $V_{\max}$  也不能恢复。

非竞争性抑制最普通的类型,是由某些试剂引起的,这些试剂能与酶活性部位以外的某些功能基团可逆地结合,而这些功能基团是维持酶分子催化活性的三维构象所必需的。某些(不是所有的)具有一个必需-SH 基的酶类由重金属离子非竞争性地抑制了,这表明为了保持酶的正常活性构型,这些-SH 基必须是完整无损的。

需要金属离子维持活性的某些酶类,可被能与这些金属离子结合的试剂非竞争性地抑制。例如:螯合剂乙二胺四乙酸(EDTA)能与  $Mg^{2+}$  和其他二价阳离子可逆地结合,因此,能非竞争性地抑制需要这些离子维持活性的某些酶类(图8-12)。

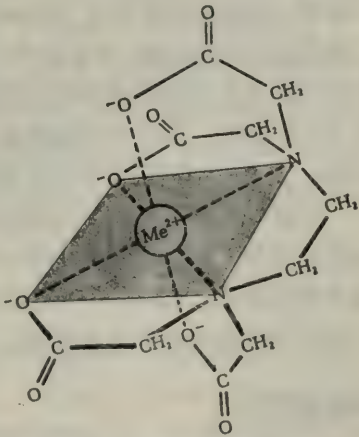


图 8-12 乙二胺四乙酸与二价金属离子 ( $Me^{2+}$ ) 的螯合物。阴影部分代表各配价键的平面。

### 不可逆抑制: 酶的修饰

在上面所讨论的酶类可逆性抑制中,抑制剂与酶或酶-底物复合物迅速地且容易可逆地平衡,因而可以根据 Michaelis-Menten 方程式来进行分析。某些试剂能够共价地和持久

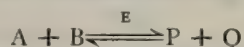
地改变酶催化作用所需的功能基团而使酶分子失活,用这些试剂处理某些酶类时,可使之发生不可逆地失活。这种类型的抑制不能用 Michaelis-Menten 原理进行处理,因为 Michaelis-Menten 方程式假定 EI 或 ESI 复合物的形成是可逆的。这种不可逆地抑制与酶的正常反应动力学相比,开始缓慢,因此,首先抑制作用是不完全的,但由于受到化学修饰的那部分酶分子的增加,抑制作用的发生随着时间而继续增加。

通过共价修饰使酶类不可逆地失活,在后面第九章中还要较详细地加以讨论,因为这在活性部位催化功能基团的鉴定方面已经得到过重要的资料。

## 有两个或更多底物的酶促反应的动力学

大多数酶类催化有两种底物相互作用的反应:这些反应比上面讨论的只有一种底物的简单反应的动力学要复杂得多。催化双底物反应的酶类,包括转移酶这一大类,它们催化特殊功能基团从一种底物转移到另一底物上(表 8-1)。

两种底物反应用符号表示其方程式如下:

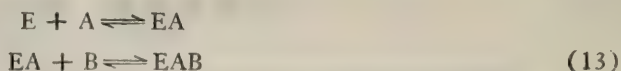


上面这个反应的动力学分析比一种底物反应的要复杂一些,因为它们可能有几种酶-底物复合物,例如:二元的复合物 EA、EB、EP 和 EQ,三元的复合物 EAB、EPQ、EAQ 和 EPB。测定双底物体系的  $K_M$  和  $V_{max}$  的方法与一种底物反应的方法相似。通常将一种底物,譬如说 B 的浓度,固定在饱和水平,而改变另一种底物 A 的浓度,以测定其对反应初速的影响,而得出底物 A 的 Michaelis-Menten 常数,即  $K_M^A$ 。通常使用三个或三个以上 B 的固定浓度以得出  $K_M^A$  值。然后颠倒实验的安排:将底物 A 的浓度保持在饱和水平不变,测定底物 B 浓度的改变对反应初速的影响,以得出底物 B 的  $K_M$ ,即  $K_M^B$ 。从双倒数图得出  $K_M^A$  和  $K_M^B$  最方便。因此当底物中的一种为饱和水平时,双底物的反应能够简化为单底物的情况。表 8-5 中列出了天冬氨酸氨基转移酶两种底物和两种产物的  $K_M$  值。

如图 8-13 所概括的大多数两个底物的反应能够归入单置换反应和双置换反应这两类反应中的一类,通过动力学分析一般是能够区分这两类反应的。然而动力学的分析不是没有错误的,因此常有必要应用其他的实验方法以识别反应的途径。下面我们将研讨在理想化的情况下的这种特性。

### 单置换反应

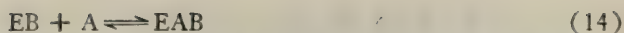
在单置换反应中,为了反应的进行,底物 A 和 B 两者必须同时存在于酶活性部位,以生成一种三元的复合物 EAB。单置换反应以两种形式出现,任意的和有顺序的,这两种形式表现在两种底物结合在酶分子上的顺序有所不同。在任意的双底物反应中,随便那一种底物都可以首先与酶结合,表明以两种不同方式可以同样地形成三元的复合物(也称为中央的复合物) EAB。



或







任意的单置换反应可被许多磷酸转移酶类所催化。肌酸激酶所催化的下列反应就是一例:



在这个反应中, ATP 和肌酸是以任意的顺序结合于酶活性部位形成一种三元的复合物。磷酸基从结合的 ATP 转移到结合的肌酸以后, 两种产物又以任意的顺序离开活性部位。

在有顺序的单置换反应中, 反应的顺序是带有强制性的, 因此一种特殊的底物, 即领先的底物, 在第二个或随后的底物与酶结合之前, 首先与酶结合, 如下面方程式所示:



上式中的 A 为领先的底物。许多脱氢酶类利用烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 ( $NAD^+$ ) 作为辅酶, 从它们的底物上接受电子, 催化有顺序的双底物反应。例如, 苹果酸脱氢酶催化下面的反应:



在上面反应中, 苹果酸脱氢酶首先必须与  $NAD^+$  结合生成  $E-NAD^+$  复合物, 然后再与苹果酸结合形成一种三元的复合物  $E-NAD^+-\text{苹果酸}$ 。

通过实验可以将任意的双底物反应和有顺序的反应区别开。如果最后的反应产物通过仅与第一个或领先的底物竞争而抑制总的反应, 这种反应为有顺序的反应。例如: 苹果酸脱氢酶的反应 [反应式 (17)] 是一个有顺序的反应, 它被过量的  $NADH$  所抑制,  $NADH$  与正常的领先底物  $NAD^+$  竞争与酶的结合; 然而  $NADH$  不与苹果酸竞争。

在某些情况下, 某些有顺序的双底物反应中的三元复合物是以非常低(几乎接近于消失)的浓度存在, 因此, 反应的产物似乎是由酶与领先底物的二元复合物  $EA$  和第二种底物  $B$  所直接产生的, 而无  $EAB$  复合物明显地生成。这种类型的行为, 首先是由 Theorell 和 Chance 发现和分析的, 在某些实验条件下, 这种行为与连接  $NAD$  的乳酸脱氢酶和醇脱氢酶一起出现。

## 双置换 (Ping-Pong) 反应

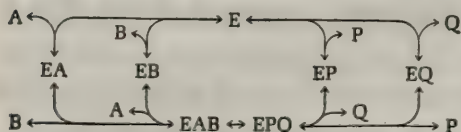
在双置换反应类型的双底物反应中(图 8-13), 酶首先必须与一种底物结合并释放一种产物之后, 才能与第二种底物结合并释放第二种产物。在这些反应中, 第一种底物与酶反应通常由于功能基的转移而使后者产生一种化学构型改变的形式。在第二步中, 这个功能基从酶转移到第二种底物上去。由天冬氨酸氨基转移酶(也叫天冬氨酸转氨酶)所催化的下列反应是双置换反应的一个例子:



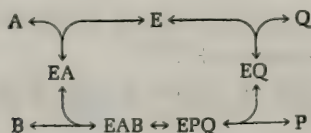
天冬氨酸这个领先的底物, 首先与酶结合。然后天冬氨酸分子上的氨基转移到酶的牢固结合辅基(磷酸吡哆醛)上。第一种产物草酰乙酸立刻脱离活性部位, 被第二种底物  $\alpha$ -酮戊二酸所置换, 然后氨基从酶分子上转移到  $\alpha$ -酮戊二酸形成谷氨酸而离开活性部位。对这些两个步骤的双底物反应给了一个形象化的名称, Ping-Pong 反应。(图 8-13)

## 单置换反应

任意的单置换反应 底物A或底物B可与游离酶E结合生成一种二元的复合物。加入另一种底物则继而生成一种三元的复合物EAB。如在此处所示,产物P和Q是以任意的顺序释放的,但未必一定都是这种情况。



有顺序的单置换反应 游离的酶E必须首先与领先的底物A结合形成二元的复合物。然后又与加入的另一种底物B结合,生成三元的复合物EAB。下图表示产物按顺序释放,但未必一定都是这种情况。



有顺序反应的一般速率方程式为:

$$v_0 = \frac{V_{\max}}{\frac{K_M^A K_M^B}{[A][B]} + \frac{K_M^A}{[A]} + \frac{K_M^B}{[B]} + 1}$$

上式中的A为领先的底物。就底物A而言,斜率-截距(双倒数)形式为:

$$\frac{1}{v_0} = \frac{1}{V_{\max}} \left( K_M^A + \frac{K_M^A K_M^B}{[B]} \right) \left( \frac{1}{[A]} \right) + \frac{1}{V_{\max}} \left( 1 + \frac{K_M^B}{[B]} \right)$$

在固定的底物B的各种浓度下,以 $1/v_0$ 对 $1/[A]$ 作图(假定在底物A和B的结合部位之间没有相互的作用)。

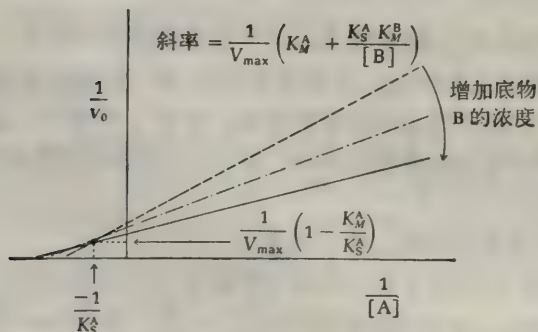
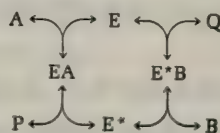


图 8-13 A + B  $\rightleftharpoons$  P + Q 这种类型的双底物反应特性的概貌。固定另一种底物浓度不变,通过 $1/v_0$ 对 $1/[S]$ 的双倒数图的特征,往往能区别不同类型的双底物反应。任意的单置换反应通常产生一些交叉的直线图形,但有时更为复杂,故在此未表示出来。如下图所示,有顺序的单置换反应,通常产生会聚性的图形,而双置换反应,通常产生平行的双倒数图形。

## 双置换反应

底物A与游离酶E结合生成复合物EA,产物P从复合物EA离开,留下共价取代的酶 $E^*$ 。然后底物B与 $E^*$ 结合生成复合物 $E^*B$ , $E^*B$ 复合物分解生成产物Q和游离酶E。



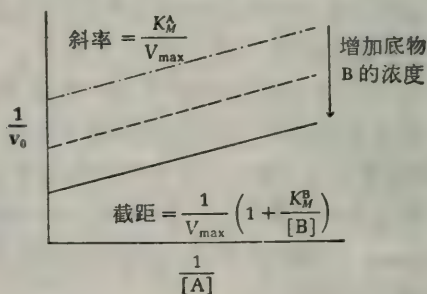
一般速率方程式为:

$$v_0 = \frac{V_{\max}}{1 + \frac{K_M^A}{[A]} + \frac{K_M^B}{[B]}}$$

斜率-截距的形式为:

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_M^A}{V_{\max}} \left( \frac{1}{[A]} \right) + \left( 1 + \frac{K_M^B}{[B]} \right) \left( \frac{1}{V_{\max}} \right)$$

在固定的底物B的各种浓度下,以 $1/v_0$ 对 $1/[A]$ 作图,其图形如下:

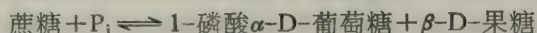




## 双底物反应的平衡交换

如在上图和图 8-13 中所概述的,虽然单置换双底物反应和双置换双底物反应常常能够由它们特殊的动力学行为加以区别,但单凭动力学分析,引出的结论不一定总是正确的。因而,通过另一标准,有时能将它们区别开来。我们将通过比较两种在形式上相似的酶促反应来加以说明,一种与蔗糖磷酸化酶反应是一种双置换反应,另一种与麦芽糖磷酸化酶反应是一种单置换反应。

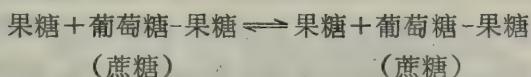
蔗糖磷酸化酶催化以下反应:



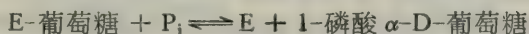
上式中二糖蔗糖包括  $\alpha\text{-D-葡萄糖}$  和  $\beta\text{-D-果糖}$ ,发生可逆地磷酸解作用生成 1-磷酸  $\alpha\text{-D-葡萄糖}$  和游离的 D-果糖。就是这同一种酶在磷酸解作用的逆反应中催化蔗糖的生物合成。详细地研究此酶表明:在既无蔗糖又无果糖存在时,它能催化游离的无机磷酸盐与 1-磷酸葡萄糖的磷酸根交换的这一交换反应,而没有磷酸盐或 1-磷酸葡萄糖任何净的变换。这种平衡交换反应的过程是以放射性同位素  $^{32}\text{P}$  标记的无机磷酸盐与未被标记的 1-磷酸葡萄糖来着手追踪的。



当交换进行时,1-磷酸葡萄糖变成了同位素标记的。同样地,在没有磷酸盐或 1-磷酸葡萄糖的情况下,蔗糖磷酸化酶也能催化用同位素标记的果糖与未被同位素标记的蔗糖的果糖部分之间的平衡交换反应。

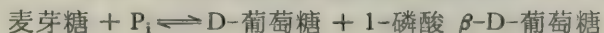


从这些和其他的事实,可以作出这样的推论,即由蔗糖磷酸化酶所催化的反应是一种双置换反应,分两步进行,并包括一种共价的酶-葡萄糖中间物,这些步骤是:



标记的游离果糖与蔗糖分子中果糖部分之间的平衡交换是由第一个反应所引起的,这一反应的进行与第二个反应无关,同位素标记的磷酸盐与 1-磷酸  $\alpha\text{-D-葡萄糖}$  分子上的 1-磷酸根之间的交换是通过第二个反应发生的,这一反应的进行又与第一个反应无关。这种蔗糖磷酸化酶反应的公式,由于直接证明靠酶的作用形成一种共价的酶-葡萄糖中间物而得到支持。

与此明显的对比,麦芽糖磷酸化酶反应是一种单置换反应的例子:



麦芽糖是由两分子 D-葡萄糖组成的一种二糖,发生的磷酸解作用在形式上类似于蔗糖磷酸化酶反应。然而在没有麦芽糖和 D-葡萄糖的情况下,麦芽糖磷酸化酶不催化磷酸盐与 1-磷酸  $\beta\text{-D-葡萄糖}$  之间的同位素交换,在没有磷酸盐和 1-磷酸葡萄糖的情况下,也不催化同位素标记的游离 D-葡萄糖与麦芽糖的葡萄糖残基之间的交换。况且在麦芽糖磷酸化酶的作用中,没有发现共价的酶-糖中间物。从这个事实和其他的证据得出结论,麦芽糖磷酸化酶反应是一个单置换反应,其中麦芽糖和磷酸盐两者必须同时存在于活性部位。当两者的动力学试验和平衡交换试验是一致时,对一已知酶促反应是一种单置换反应还

是双置换反应就可以做出一个可靠的判断。

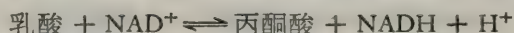
## 酶活性的定量测定

在一已知的溶液或组织提取液中,一种酶的含量可以根据它所产生的催化效果而定量测定。为此目的,须知以下几点:

1. 所催化反应的总的化学算法。
2. 酶是否需要加入辅助因子,如金属离子或辅酶。
3. 酶对底物和辅助因子浓度的依赖性,即底物和辅助因子两者的  $K_{M0}$ 。
4. 酶的最适 pH。
5. 一个温度区域,在此区域内,酶是稳定的,并具有高度活性。
6. 一种简单的分析方法,以测定底物的消失或反应产物的出现。

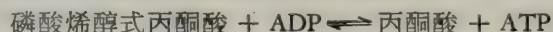
只要有可能的话,总是在最适 pH 和底物浓度在饱和水平以上的试验系统中进行酶类的测定,因此就底物而言,反应初速为零级。在这些情况下,反应初速只与酶浓度成正比。当酶类需要辅助因子如金属离子或辅酶时,它们加入的浓度也必须超过饱和,因而这个体系中真正的限速因素就是酶的浓度。通常测定反应产物形成的速率比测定底物消失的速率更为准确,因为底物必须经常保持在相当高的浓度,才能维持零级反应的动力学。

当底物或产物是有颜色的或在紫外线区吸收光,进行酶活性的定量测定是最迅速的和最方便的,因为吸收光的产物或底物的出现或消失速率能够应用分光光度计来追踪,在一条细长图纸上得出反应进行的连续记录。必须没有其他吸收光或散射光的组份,或通过适当的空白测定将之删除。乳酸脱氢酶活性的测定就是一例,此酶将电子从乳酸转移到氧化型的辅酶烟酰胺腺嘌呤二核苷酸  $NAD^+$  上(表 8-3),生成丙酮酸、还原型的辅酶  $NADH$  和一个质子。

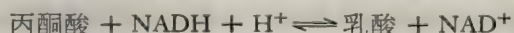


还原型的辅酶  $NADH$  吸收紫外线中 340 毫微米的光,而氧化型  $NAD^+$ 、乳酸和丙酮酸则否。因此可以通过测定分光光度计波长 340 毫微米处试验系统光吸收的增加来追踪向前方向反应的进程,这种测定方法比任何底物或产物的化学测定要简单得多。

光学测定法是如此简单和方便,所以这种方法往往用来测定底物或产物都不具有任何特殊的最大吸收光的酶促反应的时间过程,是通过将这种反应与某些其他具有易于测定光学变化的酶促反应偶联起来进行的。一个例子是磷酸烯醇式丙酮酸与 ADP 之间的反应,通过丙酮酸激酶催化磷酸基团的转移生成丙酮酸与 ATP。



虽然这个反应的底物和产物在 300—400 毫微米区域不吸收光,但这个反应是容易测定的,如果将大量过量的乳酸脱氢酶和  $NADH$  加入这个反应体系使之产生下列的偶联反应,这些反应具有共同的中间产物丙酮酸。



在过量的乳酸脱氢酶和  $NADH$  存在的情况下,在第一个反应中生成的丙酮酸,随即在第二个反应中非常迅速地被还原为乳酸。每生成和还原一分子丙酮酸,就有一分子的  $NADH$



被氧化为  $\text{NAD}^+$ ，因而引起在  $\text{NADH}$  的最大光吸收 340 毫微米处的光吸收减少。在这种偶联测定法中，通过适当的调节反应体系使活性待测的酶成为限速组份。

### 酶 活 性 单 位

用得广泛的酶活性单位规定为：在最适的测定条件下，在  $25^\circ\text{C}$  时，每分钟内使 1.0 微克分子 ( $10^{-6}$  克分子) 的底物发生变化的酶量。比活性是指每毫克蛋白质的酶单位数。它是判断酶纯度的一种标准，在提纯酶的过程中，其比活性逐渐增加，当酶处于纯净状态时，比活性变得最大和恒定。克分子活性或分子活性，以前称为转换数，是指酶为限速因素时单个酶分子(或单个活性部位)每分钟内转化底物的分子数(表 8-8)。从酶的  $V_{\max}$  值及其分子量可以计算具有单个活性部位的酶的克分子活性。在任何已知的酶中，碳酸酐酶的克分子活性最大，每分子每分钟 36,000,000。

由酶学委员会推荐的(参看参考书)新的酶活性国际单位为 katal (缩写为 kat)，是指每秒钟内转化 1 克分子底物的酶活性量。这种新单位与化学动力学中速率常数的大小是一致的，此速率常数以秒而不是以分为基准。酶活性单位也可以用微 katal (microkatal,  $\mu\text{kat}$ )，纤 katal (nanokatal, nkat) 或沙 katal (picokatal, pkat) 表示。一个老的酶单位(参看上面)等于  $1/60 \mu\text{kat}$  或  $16.67 \text{ nkat}$ 。在新协定中，比活性是用每千克蛋白质的 katal 数来表示，相当于每毫克蛋白质的微 katal 数，而克分子活性则以每克分子酶的 katal 数表示。

表 8-8 在  $20-38^\circ\text{C}$  的范围内某些酶类的分子活性<sup>†</sup>

酶	分子活性 <sup>†</sup>
碳酸酐酶 C	36,000,000
$\Delta^3$ -3-酮类固醇异构酶	17,100,000
过氧化氢酶	5,600,000
$\beta$ -淀粉酶	1,100,000
$\beta$ -半乳糖苷酶	12,500
磷酸葡萄糖变位酶	1,240
琥珀酸脱氢酶	1,150

<sup>†</sup> 分子活性是指在最适条件下，每分钟内单个酶分子转化底物的分子数。

### 酶 的 纯 化

应用上述定量测定方法测定存在于不同蛋白质部分(用在第七章中已详细叙述的方法取自细胞或组织)的催化活性量，就有可能纯化酶类和最终得到酶类的均一形式。所应用的探讨途径和操作步骤已通过纯化乙酰胆碱酯酶过程中所得到的某些实验数据说明了。应该记住，细菌细胞、植物组织或动物组织的粗提取液中可能含有几百种不同的蛋白质，其中许多是酶类，其溶解度和酸碱性质没有很大的差别。因此从这种提取液中纯化

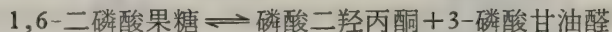
单一的酶,可以利用被分离的酶与其他存在的蛋白质之间的不同性质,根据经验选择一种分离步骤的顺序。

## 酶-底物复合物和共价的酶-底物化合物

如我们在上面所看到的,动力学的证据有力地表明,所有的酶在它们的催化循环过程中都与它们的底物短暂地结合形成酶-底物复合物。但由于酶-底物复合物不稳定,迅速分解,因而要得到它们形成的证据是困难的。尽管如此,从物理的和化学的测定仍然可以得到形成这些复合物的证据。一种探索途径是用分光镜观察底物与酶混合时所出现的瞬间光谱的变化。血红素酶类,过氧化氢酶和过氧化物酶,由于它们的血红素辅基使之具有明显的吸收光谱,当它们与其底物过氧化氢混合时,其光谱表现出瞬时的变化。这种变化反映出酶-底物复合物的形成与分解。同样地,某些酶类与它们的底物混合时,在某种波长下,光学旋光度发生变化,这些变化被解释为:伴随酶-底物复合物的形成出现酶构型的变化。

特别使人信服的是当某些酶类与迟钝的底物反应时,证明了相当稳定的酶-底物复合物的存在,也就是说,此底物容易形成一种非共价的酶-底物复合物,但与正常生物的底物相比,其分解非常缓慢。从溶菌酶、D-氨基酸氧化酶和几种其他的酶类中,已观测到这些不活泼的酶-底物复合物的存在。溶菌酶的不活泼的酶-底物复合物确已被结晶出来,并作了X射线分析,从而对活性部位的结构得到了某些揭示。证明某些酶类与竞争性抑制剂形成稳定的复合物也是可能的,这些竞争性抑制剂在结构上与底物类似,并结合在底物与酶结合的部位。在缺乏一种底物的情况下,加入另一种底物时,从某些两种底物反应中也能直接观察到酶-底物复合物的形成。例如:醇脱氢酶在没有其另一种底物乙醇的情况下,与氧化型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸形成一种复合物。

除了可逆的 Michaelis-Menten 类型非共价酶-底物复合物以外,(大概所有的酶类都可以形成这种复合物,并且当底物浓度为饱和时,复合物的分解速度便成为酶促反应的限速步骤),某些酶类,特别是那些催化双置换反应的酶类,能形成共价的酶-底物复合物作为中间物。一个典型的例子是二磷酸果糖醛缩酶,此酶可催化下列可逆的反应。



若将强还原剂氢硼化钠加入醛缩酶与用同位素标记的磷酸二羟丙酮的混合液中,将引起一种同位素标记、无催化活性的、共价的醛缩酶-磷酸二羟丙酮复合物的形成。若用酸完全水解这种复合物之后,其水解溶液中发现有一种稳定的单一赖氨酸残基的  $\epsilon\text{-N-甘油衍生物}$  (图 8-14)。但是在没有还原剂的情况下,则不形成这种衍生物。从标记产物的结构可以作出这样的结论,醛缩酶与磷酸二羟丙酮共价地而且可逆地结合,在酶的活性部位赖氨酸残基的  $\epsilon\text{-氨基}$  和底物羰基之间形成一种不稳定的 Schiff's 碱。用氢硼化合物处理,则这种非常不稳定的中间物被还原为一种稳定的,但无活性的共价衍生物。用这种方法,许多作用于带有氨基或羰基的底物的酶类,已成功地由不稳定的共价的酶-底物复合物获得其稳定的还原形式。

在某些双置换双底物的反应中,如果这个反应体系中缺少一个底物时,则可以分离出一种酶-底物复合物。例如:在没有磷酸盐的情况下,蔗糖磷酸化酶作用于蔗糖时,则形



成一种酶-葡萄糖复合物。

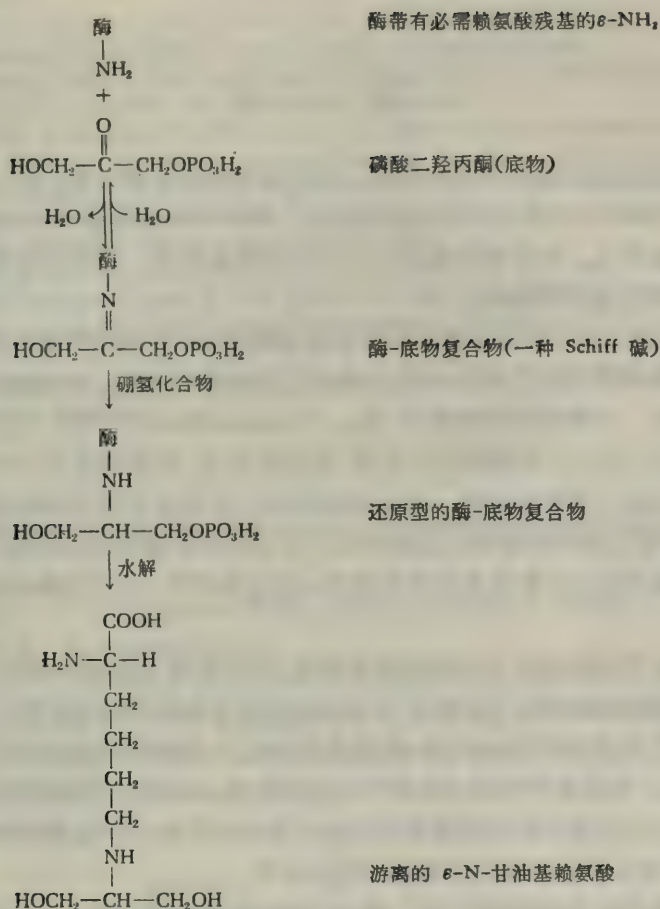


图 8-14 二磷酸果糖缩醛酶与磷酸二羟丙酮之间所形成的复合物的还原作用

## 活细胞中的酶类和底物

活细胞中的酶类可以在与试验系统(像本章中描述的试管中动力学试验一样)非常不同的条件下起作用。如果一个活细胞含有 1,000 种不同的酶类,若它们的平均分子量约为 140,000, 那么,每种酶在细胞浆中的浓度平均稍少于  $10^{-6}M$  ( $1.0\mu M$ )。某些酶类,特别是那些催化中心途径反应的酶类,可能具有较高的浓度;如己糖激酶,它催化葡萄糖与 ATP 之间的反应,使葡萄糖磷酸化。此酶存在于肌肉中,其浓度超过  $10^{-4}M$  ( $100\mu M$ )。另一方面,某些酶类,如那些催化辅酶生物合成的酶类,其浓度可能低到  $10^{-8}M$  ( $0.01\mu M$ )。

对细胞浆中作为底物的各种代谢物浓度也进行了测定。在体内各个地方大多数的总浓度为  $5-500\mu M$ 。在许多情况下,即使不是大多数的情况,完整细胞内底物的浓度是不足以使酶饱和的;确实某些情况下,细胞内底物浓度并不比酶浓度大很多。很清楚,在完整细胞内的酶类未必呈现典型的 Michaelis-Menten 动力学行为,因为 Michaelis-Menten 动力学理论是假定酶浓度与底物浓度相比,酶浓度小到可以忽略不计。因此完整细胞内

酶动力学定量分析还是处在酶学的一个早期领域,但对了解酶活性的生物调节是非常重要的。

## 摘 要

酶类是根据所催化的反应而分类的。某些酶类是简单蛋白质;另一些酶类是含有金属离子辅基、辅酶或两者都含有的结合蛋白质。辅酶和辅基起着特殊功能基团、原子或电子的中间载体的作用。许多辅酶含有一分子的某种维生素,而维生素是维持正常细胞功能所需要的微量有机营养物质。

在酶催化的反应中,增加底物浓度使反应速率增加,直到达到某一点时,这时的反应速率变得与底物浓度无关。在这一点上,酶类已被底物所饱和,就底物而言,反应变为零级。每种酶都有一个特殊的底物浓度( $K_M$ , Michaelis-Menten 常数),在此浓度下,反应速率为最大速度的一半。一种酶的反应初速、底物浓度  $K_M$  和最高速率之间的定量关系可以从 Michaelis-Menten 方程式得出, Michaelis-Menten 方程式是基于酶和底物作用可逆地形成一种酶-底物复合物作为在催化过程中的一个必要的步骤这样的假定而推导出来的。酶类具有一个最适的 pH 和最适的温度范围,在此条件下,它们是稳定的,并具有催化活性。

酶的竞争性抑制剂是指与底物竞争游离酶,并可逆地与游离酶起反应形成一种酶-抑制剂复合物的那些抑制剂,它们的作用可以通过增加底物浓度而逆转。无竞争性抑制剂不与游离酶起反应,但能可逆地与酶-底物复合物结合,而妨碍产物的形成。非竞争性抑制剂与游离酶和酶-底物复合物两者都能可逆地起反应。不可逆的抑制剂引起酶分子中某些必需功能基产生一种持久性的化学修饰。动力学试验已被用于区别各种类型的可逆性酶抑制;双倒数图在分析这些动力学数据上特别有用。

在任意的单置换双底物的反应中,酶类与两种底物形成一种三元的复合物,两种底物与酶类反应的次序是任意的。在有顺序的单置换反应中,参与反应的底物带有强制性的顺序,形成一种三元的复合物。在双置换或 ping-pong 反应中,一种底物与酶反应所生成的相应产物,在另一种底物与酶结合之前便脱离了酶分子。

通常酶类的测定是在酶被底物饱和与最适 pH 情况下,通过测定酶促反应的初速来进行的。酶-底物复合物与共价的复合物的存在已从动力学的研究、从捕获实验和分光镜的测定中推断出来。

## 参 考 文 献

### 书籍

- Barman, T.: *Enzyme Handbook*, Vol. 1, Springer, New York, 1969, Valuable Summary of the Major Properties of enzymes, classified according to the international rules.
- Bender, M. L. and L. J. Brubacher: *Catalysis and Enzyme Action*. McGraw-Hill, New York, 1973. An introductory paperback.
- Boyer, P. D.: *The Enzymes*, 3d ed. vols. 1—10, Academic, New York, 1970—1974. Extremely valuable collection of comprehensive reviews of many aspects of enzyme biochemistry.
- Colowick, S. P., and N. O. Kaplan (eds.): *Methods in Enzymology*, Academic, New York, A continuing and very valuable series of volumes on experimental techniques of enzyme assay, isolation, and substrate preparation.



Dixon, M., and E. C. Webb: *Enzymes*, 2d ed., Longmans, London, 1964. Still a classic text on general enzyme properties.

*Enzyme Nomenclature*, American Elsevier, New York, 1973. The 1972 recommendations of the Commission on Enzyme Nomenclature, including units and kinetic symbols.

Gutfreund, H.: *Enzymes: Physical Principles*, Wiley-Interscience, New York, 1972. Physical chemistry and kinetics of enzymes. Excellent and readable short treatment.

Haldane, J. B. S.: *The Enzymes*, MIT Press, Cambridge, Mass., 1965. A reprinted classic.

Laidler, K. J.: *The Chemical Kinetics of Enzyme Action*, 2d ed., Oxford, New York, 1973.

Meister, A. (ed.): *Advances in Enzymology*, Academic, New York. Annual volumes containing reviews of special topics in enzyme biochemistry.

Plowman, K.: *Enzyme Kinetics*, McGraw-Hill, New York, 1972.

Webb, J. L.: *Enzyme and Metabolic Inhibitors*, 3 vols., Academic, New York, 1963—1966.

Westley, J.: *Enzymic Catalysis*, Harper & Row, New York, 1969. Complex kinetic phenomena are given precise verbal description as well as detailed mathematical treatment.

## 论文

Cleland, W. W.: "Steady State Kinetics," in P. D. Boyer (ed.), *The Enzymes*, 3d ed., vol. 2, pp. 1—65, Academic, New York, 1970.

## 习 题

由于酶反应的动力学是许多生化研究的中心，大量的各色各样的通常遇到的问题如下：

1. 在一级反应  $A \rightarrow B$  中，当反应时间为零时，反应物 A 的浓度为 0.50 mM。2 秒钟后，其浓度为 0.25 mM。5 秒钟后，反应物 A 的浓度为多少？

2. 在二级反应  $A + B \rightarrow C$  中，当反应时间为零时，反应物 A 的浓度为 5.0 mM，而反应物 B 的浓度为 4.0 mM。1 秒钟后，A 浓度为 4.0 mM，B 浓度为 3.0 mM。3 秒钟后，反应物 A 和 B 的浓度比为多少？

3. (a) 如果某一级反应的半衰期为 0.3 秒，其速率常数 K 为多少？

(b) 95% 的反应物消失需要多长的时间？

4. 从反应  $RSO_2S^- + CN^- \rightarrow SCN^- + RSO_2^-$  得出以下的数据：

时间, 秒	30	60	120
$[SCN^-], \times 10^4 M^{-1}$	2.92	5.89	10.79

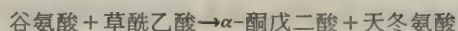
设  $CN^-$  的初浓度为 0.125 M 及  $RSO_2S^-$  的初浓度为 0.0035 M，试计算假一级反应的速率常数。

5. 当一个酶催化的反应以 80%  $v_{max}$  的速度进行时，存在于  $K_M$  与  $[S]$  之间的关系如何？

6. 在不同浓度抑制下，以  $1/v_0$  对  $1/[S]$  作图，在横坐标轴上的截距等于  $\frac{-1}{K_M(1 + [I]K_I)}$ ，证明这种酶促反应为竞争性抑制。

7. 取 10.0 毫升纯酶溶液（每毫升含 1.0 毫克蛋白质），加入刚刚足够的  $AgNO_3$ ，使酶完全失去活性。共需 0.342 微克分子  $AgNO_3$ 。计算此酶的最小分子量。

8. 转氨酶催化下列反应：



在这个催化过程中，磷酸吡哆醛（PP）作为辅酶起作用。当改变 PP 浓度而保持谷氨酸与草酰乙酸浓度以及其他条件不变时，获得以下的数据，试从这些数据中计算酶蛋白-辅酶复合物的  $K_M$ ：

每分钟谷氨酸消失的毫克数	0.17	0.27	0.43	0.65	0.73	0.78	0.79	0.81
加入 PP 的量 ( $\mu M$ )	0.30	0.50	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	10.0

9. 水杨酸酯抑制谷氨酸脱氢酶的催化作用。

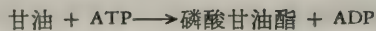
- (a) 用图解法分析以下数据,确定抑制反应的类型。假定水杨酸酯浓度维持 40 mM 不变,再计算 (b) 酶的  $K_M$  和 (c) 酶-抑制剂复合物的离解常数  $K_I$ 。

底物浓度 (mM)	每分钟产物的毫克数	
	无水杨酸酯存在	有水杨酸酯存在
1.5	0.21	0.08
2.0	0.25	0.10
3.0	0.28	0.12
4.0	0.33	0.13
8.0	0.44	0.16
16.0	0.40	0.18

10. 从酶促反应以下数据确定 (a) 抑制类型, (b) 酶的  $K_M$  和 (c) 抑制剂-酶复合物的  $K_I$ 。

底物浓度 (mM)	每小时产物的微克数	
	无抑制剂	6 mM 抑制剂
2.0	139	88
3.0	179	121
4.0	213	149
10.0	313	257
15.0	370	313

11. 甘油激酶催化以下反应:



下面的结果是在反应混合液中添加 ATP 铬盐所得:

ATP 铬盐的浓度 ( $\mu\text{M}$ )	$v_0$ (任意单位)				
	0.100	0.050	0.033	0.025	mM 甘油
0	50.0	40.0	33.3	33.3	
10	6.25	6.06	6.06	5.88	
20	3.45	3.13	3.08	3.23	
30	2.38	2.27	2.35	2.33	

- (a) 根据类型将抑制分类

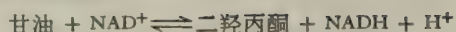
- (b) 计算抑制剂常数  $K_I$  的值

12. 在底物 A 不同的固定的浓度下,当  $1/v_0$  作为  $1/[B]$  的函数作图时,在一个有顺序的单置换反应中, A 是反应中的领先底物,而 B 是随后的底物,作出: (a) 斜率; (b) 截距; (c) 与交点的横坐标和 (d) 与交点的纵坐标的代数表示法。

13. 二磷酸核苷激酶催化 ATP 末端的磷酸基转移到受体二磷酸核苷分子上去。  $\text{ATP} + \text{UDP} \longrightarrow \text{ADP} + \text{UTP}$  反应的动力学研究得出以下结果。在不同的固定的 UDP 浓度下,以  $1/v_0$  对  $1/[\text{ATP}]$  作图,得到一些平行线的图形;在不同的固定的 ADP 浓度下,以  $1/v_0$  对  $1/[\text{UTP}]$  作图,也得到一些平行线的图形。发现 ADP 和 UTP 为交互竞争性抑制剂, ATP 和 UTP 亦如此。并发现此酶催化 UTP 和 UDP、ATP 和 ADP 之间的同位素交换反应。提出一个与这些观察一致的反应机理。

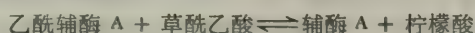


14 甘油脱氢酶催化以下的反应:



已经报导了产气杆菌中酶的动力学性质如下: 在不同的固定的  $\text{NAD}^+$  浓度下, 以  $1/v_0$  对  $1/[\text{甘油}]$  作图, 得到一些直线, 在  $1/v_0$  轴的左侧相交。同样地, 在不同的固定的二羟丙酮浓度下, 以  $1/v_0$  对  $1/[\text{NADH}]$  作图。亦在  $1/v_0$  轴的左侧相交。发现就  $\text{NAD}^+$  而论,  $\text{NADH}$  是竞争性抑制剂, 而二羟丙酮为无竞争性抑制剂, 就像固定的底物在高浓度时, 就  $\text{NADH}$  而论, 甘油是无竞争性抑制剂一样。得出一个与这些观察一致的反应机理。

15. 柠檬酸合成酶催化以下反应:



当研究大鼠脑组织中此酶的动力学性质时, 得到以下结果。在不同的固定的草酰乙酸浓度之下, 以  $1/v_0$  对  $1/[\text{乙酰辅酶 A}]$  作图, 得到一些直线的图形, 在  $1/v_0$  轴的左侧相交。当草酰乙酸、辅酶 A 与柠檬酸各作为改变的底物时, 亦得到同样的结果。抑制作用的研究表明, 乙酰辅酶 A 与辅酶 A 是交互竞争的, 而柠檬酸是草酰乙酸与乙酰辅酶 A 两者的竞争性抑制剂。得出一个与这些观察一致的动力学机理。

[文震西译 唐恢玲校]

## 第九章 酶：作用机理、结构和调节

最引人注意的酶属性之一是它们作用的特异性，所以酶只作用于一定的底物而且仅能催化一类反应，没有副反应也没有副产物。有机化学家在实验室进行一种反应时，若能得到 90% 的产量，就感到满意了。然而如果在有十个连续步骤的代谢过程中，每一步的产量少到 90% 的话，则起始物约只有三分之一能在最终产物中得到回收。显然，若不是由于酶有特异性的话，细胞将迅速被副反应及副产物所充斥。

酶的另一显著特性是它们的巨大催化能力。虽然酶是蛋白质，分子比较脆弱，但它们可以在稀的水溶液中，在生理 pH 和适当的温度下发挥其不平常的催化效应。这与在有机化学实验室内为增加化学反应速度常需相当剧烈的条件形成鲜明对照。

本章将不仅讨论酶作用的机理和特异性，同时也要讨论不同类型调节酶的性质和结构。在细胞内的多酶体系中这些调节酶起一限速作用，同时在代谢通路的整合作用中也是重要因素。

### 酶对底物的特异性

有关酶的特异性最早的重要研究工作之一是由 Fischer 进行的，他发现水解糖苷的酶能区分糖苷的立体异构型。根据此发现在 1894 年他提出一条原理，认为底物分子与酶的活性中心的配合是一种锁与钥匙、或互补的关系。

与人造催化剂比较，酶的特异性一般是很高的，但它们之间在特异程度方面仍有很大的差异。某些酶对一已知底物具有几乎完全的绝对特异性，而对一些结构非常近似的分子

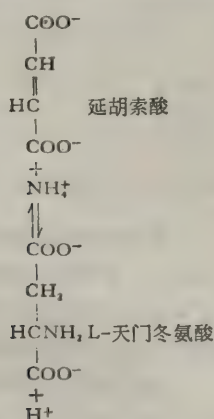


图 9-1 天冬氨酸酶反应，天冬氨酸有较严格的底物特异性，它不能催化甲基延胡索酸、延胡索酸酯或酰胺、 $\alpha$ 、 $\beta$  不饱和一羧基酸或顺丁烯二酸的加氨作用，也不能催化氨基丙二酸、谷氨酸或各种  $\alpha$ -氨基一羧酸的脱氨。

则无作用；另外一些酶则可作用于具有共同主干结构的整个一类分子，但速度可有很大差异。天冬氨酸氨裂解酶，通称天冬氨酸酶，是一个具有几乎完全的绝对特异性的例子（图 9-1）。而且它还具有严格的立体异构特异性：它既不能使 D-天冬氨酸脱氨，也不能使延胡索酸的顺型几何异构体（顺丁烯二酸）加氨。事实上，正是许多酶的绝对立体异构特异性是很值得注意的，因为人造催化剂一般不能选择性地作用于一对立体异构体中的一个。其他具有立体异构特异性的酶还有：对乳酸的 L-立体异构体有特异性作用的乳酸脱氢酶，以及对各种氨基酸的 D-型异构体有特异性作用的 D-氨基酸氧化酶。有些酶如乌头酸



酶甚至还能区别在一个不对称碳原子上的两个相同的取代基。

在酶谱的另一个极端则是具有比较广泛特异性的酶，它们能作用于许多不同种类但结构相关的底物，不过反应速度差别很大。这一类酶中有碱性磷酸酶(能水解多种不同的磷酸酯)及羧基酯酶(能催化水解各种羧酸的酯)，还有羧肽酶(可催化水解多肽的 C-末端肽键)，并且这反应与肽链的长度以及 C-末端氨基酸残基的种类无关。

研究酶的底物特异性表明，基于互补的原则，底物分子一般从两种不同的结构特点来反映酶活性中心的结构：(1) 底物必须有一个可被酶作用的易感化学键；(2) 它常常还要具备某种可与酶活性中心结合的其他结构，推测这可能是使底物分子处于一定的几何关系以致易感键能被酶作用。例如，对乙酰胆碱酯酶底物特异性的研究表明，尽管易感键是胆碱与乙酰基之间的酯键，但分子上能定位或结合至酶活性中心上的那部分结构却是连接非极性基团的带正电荷的季铵基(图 9-2)。乙酰胆碱酯酶的竞争性抑制剂的结构也必须具有这种定位基团。确实，分析竞争性抑制剂所必需的结构提供了很多对酶活性中心有价值的知识，因为竞争性抑制剂能与活性中心结合却不能被酶作用。

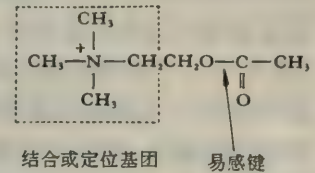


图 9-2 乙酰胆碱酯酶的底物——乙酰胆碱的定位基团及易感键

糜蛋白酶的底物特异性曾由 M. Bergmann 及 J. S. Fruton 详细图示，提供了一个特别有益的例子(图 9-3)。由于糜蛋白酶是分泌到小肠中的，开始认为它可能是对进食蛋白质被胃蛋白酶作用后生成的较长的肽链水解有特异性，但后来证明糜蛋白酶也能作用于短肽。用各种人工合成的肽类作为底物进行实验表明，此酶是一种内肽酶；即它可断裂一定类型的肽键，而不论它是在肽链的什么位置，与外肽酶对比，外肽酶则只能作用于末端

某些被糜蛋白酶水解的化合物，箭头指示作用部位。

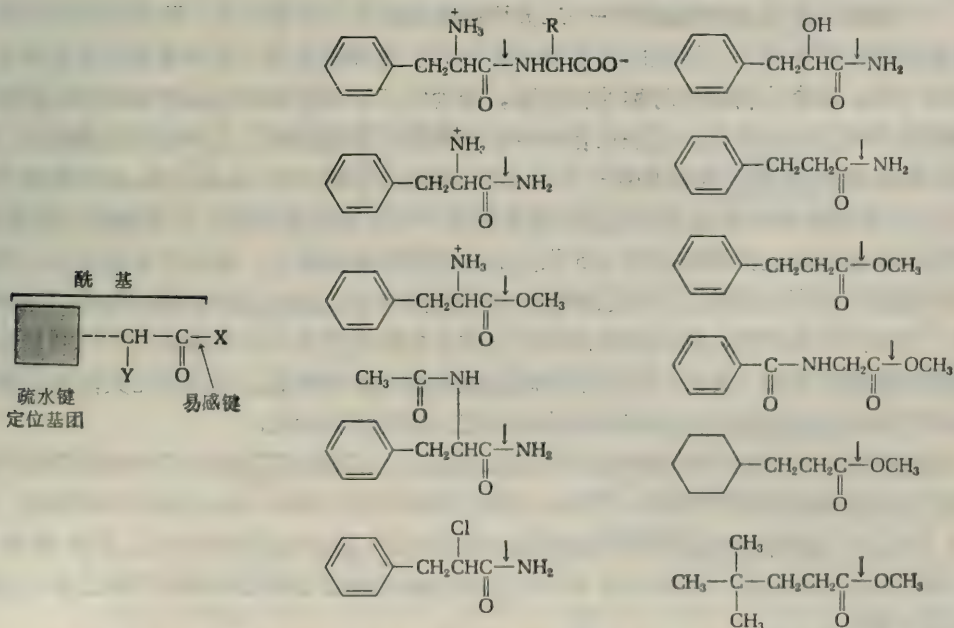


图 9-3 糜蛋白酶底物特异性，从合成底物(右)的特异性研究，结论认为，糜蛋白酶是一种疏水性酰基转移酶，严格地说不是一种肽酶。其作用所必需的基本结构如上。

肽键。另外,糜蛋白酶对芳香族氨基酸如酪氨酸、色氨酸及苯丙氨酸提供羧基所形成的肽键是有特异性的;它也能水解由这些氨基酸形成的酰胺。

令人惊异的是后来用人工合成底物研究证明,糜蛋白酶不仅能水解芳香族氨基酸的肽类和酰胺,而且也能水解它们的酯。事实上,酪氨酸酯是糜蛋白酶作用最强的底物。另外一个出乎意料的发现是糜蛋白酶能催化芳香族酰基转移到除水以外的酰基受体上,如氨、其他氨基酸或醇类等。然而传统认为糜蛋白酶作用所需的芳香环也不是必要的,因为将苯丙氨酸的苯环用环己烷或其它大分子的碳氢基团取代,也不会引起活性有较大的下降。而且甚至芳香族氨基酸的 $\alpha$ -氨基也不是必要的,因为它可用氢原子、羟基或氯原子取代(图 9-3)。严格地说糜蛋白酶完全不是一种肽酶;应该更确切地把它视为是一种“疏水酰基转移酶”。它的活性部位有两个特殊的组成部分,一是疏水部分能与底物结合并将它固定在活性部位,另外一个催化部分,起脱水和转移酰基的作用(图 9-3)。这样对底物特异性及竞争性抑制剂的结构要求的研究使有可能描绘出许多酶的活性部位。

## 催化作用必需的功能基团的鉴定

另一种有利于了解活性部位的方法是用一些试剂与酶分子上不同类型的功能基团共价结合使之改变,以了解这些基团是否为催化活性所必需。烷化剂碘乙酸的作用就是一经典方法。在 pH5.5,用碘乙酸处理核糖核酸酶,使酶烷化而失去催化活性。这一处理将形成两种不同类型的无活性的酶,一种是在第 119 位上的组氨酸残基的异吡唑环被烷化,另一种是第 12 位上的组氨酸被烷化。因为在此条件下,核糖核酸酶分子上再没有其他功能基团能被烷化,故可结论为:核糖核酸酶的第 12 及第 119 位上的组氨酸残基是催化活性所必需的。

另一重要例子是磷酸化试剂——二异丙基氟磷酸作用于某些酶,可将其特定的丝氨酸羟基磷酸化而生成一无活性的衍生物(图 9-4)。这种试剂是一类有毒性的有机磷化合物中的一种。这类化合物有时称为神经毒,因为它们能与影响神经系统功能的乙酰胆碱酯酶结合并使之完全失活。这些化合物中有些是用作杀昆虫剂。二异丙基氟磷酸不仅能抑制乙酰胆碱酯酶,同时也能抑制一些其他酶,例如:糜蛋白酶、胰蛋白酶,磷酸葡萄糖变位酶,以及几种酯酶等。在这些酶的活性部位都有一个必需的丝氨酸。对于糜蛋白酶来说,二异丙基氟磷酸能选择地将其第 195 位上的丝氨酸残基磷酸化,因此可鉴定出这个残基是它的催化作用所必需的。如将已磷酸化的酶部分水解,磷酸丝氨酸残基仍保持完整并能在一个肽片段中找到。对磷酸化肽进行化学分析能提供有关这类酶活性部位周围的氨基酸顺序的重要资料(表 9-1)。我们有时称这类酶为丝氨酸酶。经磷酸化失活的丝氨酸酶有时可用与磷酸化剂反应比酶还强的试剂使之慢慢地再活化。

酶催化活性所需的那些功能基团常常比酶分子上不直接参与催化作用的同样的基团更易反应,这一现象是很重要的。例如,核糖核酸酶含有许多能与碘乙酸反应的基团,但第 11 位及 119 位的组氨酸异吡唑基的反应性要比所有其他的基团强很多。同样糜蛋白酶含有许多丝氨酸残基,但只有第 195 位上的丝氨酸残基可在温和条件下被二异丙基氟磷酸所磷酸化。

另一种鉴定酶活性部位的必需功能基团的方法为亲和标记法。此法系让酶与一人工



合成的类似真正底物的分子反应。它和真底物一样与活性部位特异地结合，但它还具有另外一个功能基团可以与酶活性部位上或其附近的某种特殊基团迅速地起共价反应。图 9-5 示糜蛋白酶一种亲和标记物的结构，表明其分子与糜蛋白酶的正常底物有许多类似

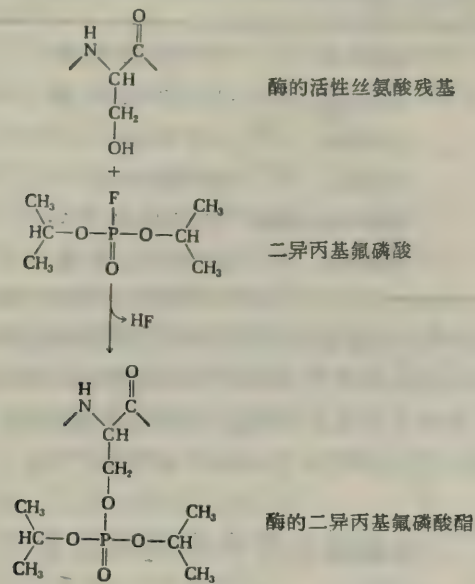


图 9-4 一种丝氨酸酶无活性磷酸化衍生物的形成

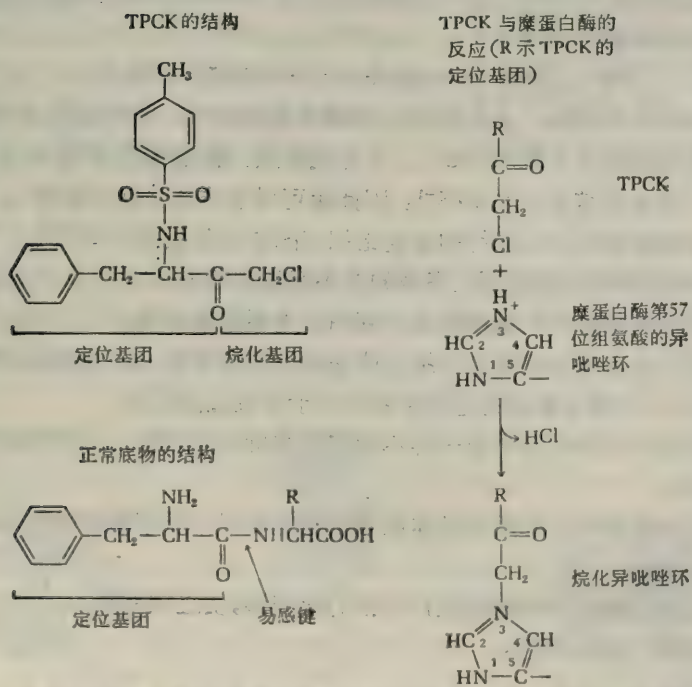


图 9-5 一种亲和标记物与糜蛋白酶的反应。亲和标记物，N-甲苯磺酰-L-苯丙氨酸酰氯甲酮，(TPCK)，是设计成与糜蛋白酶正常底物类似，但是底物上易感结构 (—CO—NH—) 代之以 —CO—CH<sub>2</sub>Cl 基团，这是一种强烷化剂。将 TPCK 与糜蛋白酶保温，它和正常底物一样，能与活性部位结合，但不像底物被水解而是使酶的第 57 位组氨酸残基被烷化，说明后者与正常被水解的易感键很近似。将酶的全部肽键水解后可分离出烷化组氨酸残基。

的地方,也表明它与糜蛋白酶第 57 位组氨酸结合的化学反应基团。这样就确定了糜蛋白酶第 57 位上的组氨酸及第 195 位上的丝氨酸(见前)与其催化活性有关。

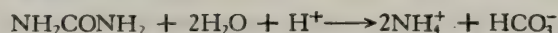
表 9-1 某些酶的活性丝氨酸残基附近的氨基酸顺序

糜蛋白酶	-甘-天冬-丝-甘-甘-
胰蛋白酶	-甘-天冬-丝-甘-脯-
凝血酶	-天冬-丝-甘-
弹性酶	-甘-天冬-丝-甘-
磷酸葡萄糖变位酶	-苏-丙-丝-组-天冬-
磷酸化酶	-谷-异亮-丝-缬-精-

还可利用一些其他的化学方法鉴定各种酶中与催化活性有关的氨基酸残基。例如,在上一章中曾讨论到醛缩酶的酶-底物复合物用强还原剂氢化硼钠还原时,使该复合物处于一种稳定的还原状态。部分水解还原了的酶-底物复合物生成一种含有特定赖氨酸的甘油衍生物的肽,此赖氨酸与底物形成一个 Schiff's 碱中间产物。

## 与酶催化效率有关的因素

酶作为催化剂的效率如何?它们实际上能使反应速度提高多少呢?从尿素的水解反应中已经获得定量的答覆。



从刀豆分离的脲酶可催化上述反应。在没有酶存在时,此反应在 pH 8.0 及 20℃ 下的一级反应速度常数约为  $3 \times 10^{-10}\text{S}^{-1}$ 。与此成对照,脲-脲酶复合物在同样条件下分解生成产物的一级速度常为  $3 \times 10^4\text{S}^{-1}$ 。因此酶可增加非催化反应速度达  $10^{14}$  倍左右。类似的计算也表明酶催化反应进行的速度比相应的非催化反应大  $10^8$  到  $10^{20}$  倍。只有极个别别人造催化剂接近酶的活性,而大多数的效率远远比酶低。

酶所以能大大地加速反应速度似与下列四个主要因素有关:

1. 酶可能以下述方式与底物分子结合使底物上的易感键 (a) 与酶的活性部位的催化基团紧密靠近; (b) 与催化基团的定位关系有利于形成过渡状态。
  2. 有些酶可能与底物结合形成一种不稳定的共价中间产物,这种中间产物更易进行生成产物的反应。
  3. 倘若酶的功能基可以起质子供体或质子受体作用,那末酶就能够起广义的酸或广义的碱的催化作用。
  4. 酶可能导致底物分子的易感键产生张力或变形,使之较易断裂。
- 这些因素将逐一讨论如下。

### 底物与酶靠近和定向:轨道控制

酶增加反应速度最简单的可能方式是将底物结合或固定于活性部位,因此在一狭小的局部范围内大大增加底物的有效浓度。根据计算,在活性部位的底物有效浓度也的确



能高达 100 M，或者说，比酶溶液中可能只有 0.001 M 的底物总浓度要大  $10^5$  倍左右。由于化学反应速度与反应物浓度成正比，可以预料，在这种局部的高浓度下，反应速度将会极大的提高。

用有机模式反应设计了许多有意义的实验以阐明底物与酶靠近的有关因素。在一种这样的模式反应中将两个反应基团共价连接在同一分子内，所以它们必然会紧密靠近。这样，反应就不是在分子间而是在分子内进行，这是由邻基辅助效应而增加反应速度。一个最著名的例子是由 T. C. Bruice 及其共同工作者进行的，那就是二羧酸-酚酯类水解的分子内催化，其中游离的羧基起着催化剂作用（图 9-6）。在这个模型中起催化作用的羧基愈靠近易感酯键则反应速度愈快。在最突出的例子中，反应速度可增加达 53,000 倍。

必然会提出这样的问题：究竟这种反应速度的增加仅仅是由于反应基团靠近，还是因反应分子之间彼此成一特殊定位关系的结果。Storm 及 Koshland, Jr 曾设想酶活性基团的主要作用就是产生轨道控制，即底物与酶催化基团相互间有精确定位，所以它们的结合轨道以特殊的关系排列使酶底物复合物直接转变为过渡状态（图 9-7）。这一假说已引起热烈的争论，我们将在后面再回来讨论这问题。

### 共价催化

某些酶加速化学反应的另一种方式是在酶与底物之间形成一个具有高度反应性的共价结合的中间产物，它以较大的机率转变为过渡状态，因而使底物能以较低能量达到活化能阈。

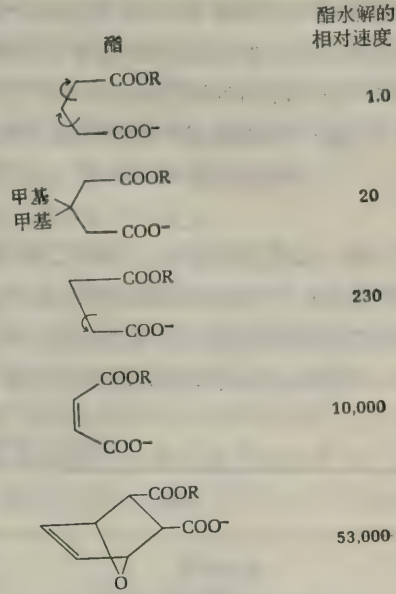


图 9-6 催化基团与底物的靠近对反应速度的影响。在这些分子内模型中广义的碱基—— $\text{COO}^-$ 是催化基团。而酯键则是底物。R 是一个对溴苯基。酯键的断裂伴有环化产生酸酐。因为羧基能自由地对酯键采取许多不同的位置，在这一系列化合物中这种自由度受到限制。所以它的催化活性加强了表示“靠近”因素的重要性。（引自 T. C. Bruice and S. J. Benkovic, *Bioorganic Mechanism*, Vol. 1. p. 178, 1966）

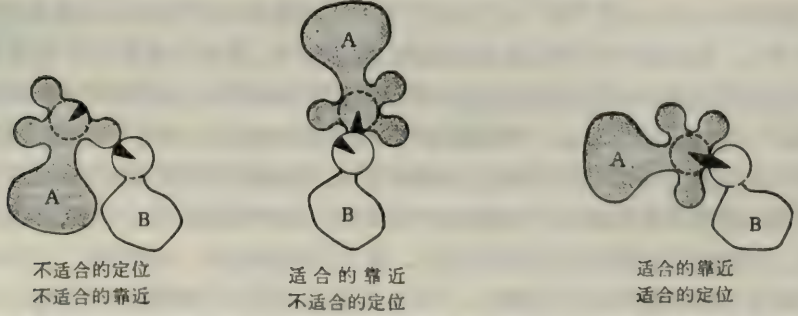
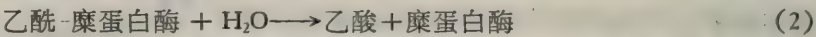
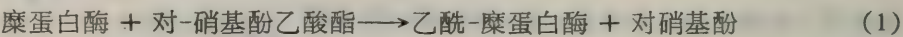


图 9-7 轨道控制学说的示意图。此学说认为底物和酶的催化基团不仅必须靠近，而且要有合适的排列，使有关的轨道重叠。这样一来，形成过渡态的机率也就较高。[引自 A. Dafforn and D. E. Koshland, Jr. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 52: 780 (1973)]

很多酶都形成共价结合的酶-底物中间产物(表9-2)。如果糖二磷酸醛缩酶在它的作用下可形成共价 Schiff's 碱中间产物,已讨论过了这一例子。糜蛋白酶也是形成一种共价中间产物。当此酶与等克分子的对硝基酚乙酸酯(一种水解比较慢的基质)混合时,游离对硝基酚释出的速度比另一种产物——乙酸释出要快一些。定量分析此种作用可作出如下结论:对硝基酚乙酸酯的水解是分两步进行的,如:



第一步反应比较快,但第二步,即释放乙酸的反应相当慢。乙酰-糜蛋白酶中间产物在较低pH下较稳定且能分离出来。当用三甲基乙酸酯作为糜蛋白酶的底物时,将形成三甲基乙酰糜蛋白酶。后者很稳定,可成结晶析出。在催化过程中酰化了的功能基是第195位上的丝氨酸残基。已知此残基用二异丙基氟磷酸处理时可磷酸化。

表 9-2 某些形成酶-基质共价化合物的酶

酶	共价中间产物类型
丝氨酸类	
磷酸葡萄糖变位酶	磷酸-酶
乙酰胆碱酯酶	乙酰-酶
胰蛋白酶	乙酰-酶
糜蛋白酶	乙酰-酶
弹性酶	乙酰-酶
半胱氨酸类	
磷酸甘油醛脱氢酶	乙酰-酶
木瓜蛋白酶	乙酰-酶
乙酰辅酶A酰基转移酶	乙酰-酶
组氨酸类	
葡萄糖 6 磷酸酶	磷酸-酶
琥珀酰辅酶A合成酶	磷酸-酶
赖氨酸类	
果糖二磷酸醛缩酶	Schiff's 碱
转醛基酶	Schiff's 碱
D-氨基酸氧化酶	Schiff's 碱

以共价酶-底物中间产物方式发挥作用的酶是根据与底物反应的氨基酸的种类分类的表(9-2)。丝氨酸类包括乙酰胆碱酯酶、糜蛋白酶、胰蛋白酶及磷酸葡萄糖变位酶。这些酶中一个特定的丝氨酸残基的羟基参与形成酯类中间产物,或与酰基形成酰基-酶,譬如糜蛋白酶;或与磷酸基形成一种磷酸酶(phospho enzyme)中间产物,譬如磷酸葡萄糖变位酶。而半胱氨酸类则是形成共价结合的硫酯键,这是由底物的酰基与酶活性部位的一个特定的半胱氨酸残基形成的。这类酶包括磷酸甘油醛脱氢酶及一种蛋白水解酶——木瓜蛋白酶。组氨酸类包括某些磷酸转移酶,譬如琥珀酰辅酶A合成酶。这种酶的一个特定的组氨酸残基的异吡唑基被磷酸化。赖氨酸类以果糖二磷酸醛缩酶为代表,酶的赖氨酸残基上的ε-氨基与底物的羰基形成 Schiff 碱的中间产物。很多形成共价中间产物的酶表现为双置换(或乒乓)反应的典型动力学特征。



为什么形成共价酶-底物复合物就可能使整个反应大大加速呢？回答这个问题必须首先复习一下有机反应机制的几条原理。在共价催化中最常见的反应方式有催化剂的亲核基团作用于底物的亲电子碳原子。亲核(能寻找核的)基团含有富于电子的原子可提供电子。亲核体是高效而作用广泛的催化剂,例如,它们能促进简单有机酯类的水解及使酰基从一个化合物转移到另一化合物上。酶分子至少含有三种具有潜在催化功能的亲核基团,它们是: 组氨酸的异吡唑基、丝氨酸的羟基及半胱氨酸的巯基(图 9-8)。此外,许多辅酶也具有亲核中心。

一个亲核基团能够催化酰基转移反应,其中酯类的水解是一个特殊情况,因为它作用于含酰基的分子,生成一种亲核基团的酰基化合物。这种含酰基的分子称为酰基供体。催化剂的酰基衍生物其作用如同反应中的中间产物一样。在第二步反应中酰基就从亲核催化剂转移到最后的酰基受体分子上,酰基受体可能是某种其他的醇,或就是水。如图 9-9 所示,为了使亲核催化作用能够发生,底物与亲核催化剂的反应速度必须比没有催化剂时底物与最后的酰基受体的反应要快,而且形成的酰化催化剂与最后酰基受体之间的反应也必须比原来底物(无催化剂时)与酰基受体的反应要快。通过这种方式,共价中间产物的形成就能降低酰基转移反应的活化能。

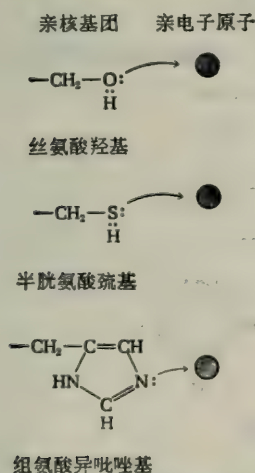
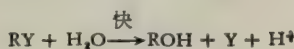
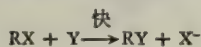


图 9-8 蛋白质的重要亲核基团

未催化的反应



被亲核试剂 Y 所催化:



上二式相加:

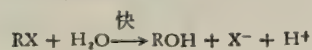


图 9-9 亲核催化剂对反应速度的加速。注意亲核催化剂 Y 在催化循环末又再生出来。

## 酸碱催化作用

广义来说,酸和碱是有机反应中用途最广和最普遍的催化剂。酸碱催化有两种主要类型:狭义的酸碱催化和广义的酸碱催化。狭义的酸和狭义的碱催化是指反应速度的加速,仅仅与  $H^+$  或  $OH^-$  离子浓度成比例。广义酸和广义碱所催化的反应速度的加速与广义酸和广义碱(按 Brönsted 及 Lowry 的定义即分别为质子供体和质子受体)的浓度成比例。

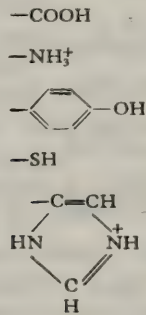
由  $H^+$  或  $OH^-$  起作用的狭义的酸碱催化在酶促反应中的重要性比较有限,但是广义的酸碱催化很可能与酶促反应有关。细胞内许多有机反应均属这种催化类型。这些反应包括羰基的加水、羧酸酯和磷酸酯的水解、双键的脱水反应、各种分子的重新排列,以及许多

取代反应等。已知酶分子含有几种功能基团可以起广义的酸或广义的碱的作用,如氨基、羧基、巯基、酚羟基及异吡唑基等(图 9-10)。

在广义的酸或碱的催化反应中,在催化循环的某些步骤中催化剂起一质子受体或供体的作用。具体的质子转移步骤通常是在过渡状态的碳原子上来回进行。例如,如果某些酶促反应是在氧化氘( $D_2O$ )中而不是在水( $H_2O$ )中进行,则反应速度将大大降低。这表明质子化反应是一限速反应,因为重氘离子( $D^+$ )与广义的碱反应要比质子( $H^+$ )慢很多。有时,在协同进行的质子转移中,广义的酸和广义的碱都是作为催化剂。在这类反应中,广义的酸提供一个质子给过渡状态物质,而广义的碱则接受一个质子。

有两个重要因素影响广义酸碱催化反应的速度。第一个是广义的酸或碱的强度,即它的质子离解常数。最活泼的广义的酸碱催化剂是组氨酸的异吡唑基,它的  $pK'$  大约是 6.0,这使它在接近生物体液的  $pH$  下,既能作为质子供体又能作为质子受体。第二个重要因素是酸或碱能提供或接受质子的速度。这里又是异吡唑基有特别高的效率,因为它不仅在中性  $pH$  附近质子化和去质子化的速度大致相同,而且反应非常迅速,其半反应时间少于 0.1 ns。事实上,特定组氨酸残基上的异吡唑基参与了许多不同酶的催化循环反应。如前所述,异吡唑基也是一种强亲核体。因为多数蛋白质中的组氨酸残基比较少,在生物进化中可能选择这种氨基酸在酶促催化中起一种特殊作用。

蛋白质的某些广义的酸性基团(质子供体)



蛋白质的某些广义的碱性基团(质子受体)

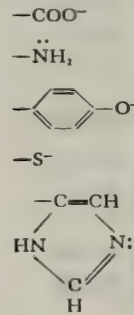


图 9-10 能起广义酸碱作用的蛋白质功能基团

广义的酸-碱催化作用提供一种在  $H^+$  和  $OH^-$  浓度都很低的中性  $pH$  下促进化学反应的手段,否则这些化学反应将需要非常高浓度的  $H^+$  或  $OH^-$ 。例如,肽键的非酶促水解需要很高浓度的  $H^+$  或  $OH^-$ ,反应时间长并需要在高温下才能进行,而用糜蛋白酶催化,则由于活性部位的广义酸碱催化作用,在中性  $pH$  下肽键能迅速水解。

### 酶催化作用的张力因素: 酶构象与催化活性的关系

酶生物化学家面前长期面临两个问题:为什么酶的催化活性一般都需要酶分子的天然三维构象呢?为什么与底物分子作用的结构相比较酶分子需要那么大?对核糖核酸酶及其他酶的研究提供了某些线索。我们已知核糖核酸酶的催化活性需要第 12 及第 119 位上的组氨酸残基,说明多肽骨架上被 107 个残基隔开的两个组氨酸由于多肽链这样地折叠而使它们在活性部位上靠得很紧。这个观点被 Richards 及其共同工作者所作的某些有趣的实验所证实。他们观察了断裂核糖核酸酶多肽骨架的实验结果。枯草杆菌蛋白酶



能在第 20 及 21 位残基间断裂。核糖核酸酶 124 个残基的肽链(图 9-11)。长的碎片称为 S 蛋白,它含有第 119 位上的组氨酸,而短碎片称为 S-肽,则含有第 12 位上的组氨酸。S 肽及 S 蛋白分别单独测试都没有催化活性,只要将它们在 pH7.0 混合起来,这两段碎片并没有形成共价连接,酶的活性又可恢复。显然 S-肽是通过微弱的作用力与 S-蛋白结合,例如氢键疏水作用等。这样,虽然介于两个重要的组氨酸残基之间的多肽链已经断裂,但仍可将两个组氨酸带到活性部位上使互相靠拢。

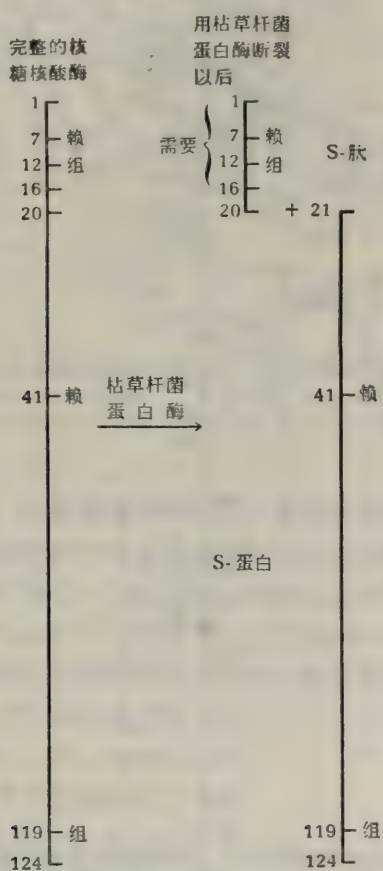


图 9-11 核糖核酸酶活性需要的 S-肽及 S-蛋白。重建酶活性不需要将碎片共价连接起来,而只需将它们混合。

糜蛋白酶又是一个类似的例子,此酶分泌出来时是一个无活性的前事物,或酶原,称为糜蛋白酶原。糜蛋白酶原只有一条含 245 个残基的多肽链,由五个链内双硫键连接起来(图 9-12)。它被胰蛋白酶及糜蛋白酶相继作用后,酶促水解断裂四个肽键,释放出两个二肽,便转化成为有活性的  $\alpha$ -糜蛋白酶。这样形成的活性  $\alpha$ -糜蛋白酶是由三条多肽链通过两个—S—S—键连接在一起所构成。因此,催化活性所必需的组氨酸 57 及丝氨酸 195 这两个特异性残基分布在两条不同的肽链上。然而用 X 射线分析糜蛋白酶的三级结构,直接证明了这些残基在天然酶的构型中确是相互靠近的。(图 9-12 及 9-13)

长期来设想,紧密折叠、盘绕的多肽链构型的变化可能对催化过程起一定的作用。实际上,用旋光测定证明许多酶在它们的催化循环反应中确实发生了构型变化,而且 X 光衍射也证明游离羧肽酶的构型与用反应迟钝的底物(如甘氨酸酰胺)饱和了的羧肽酶构型

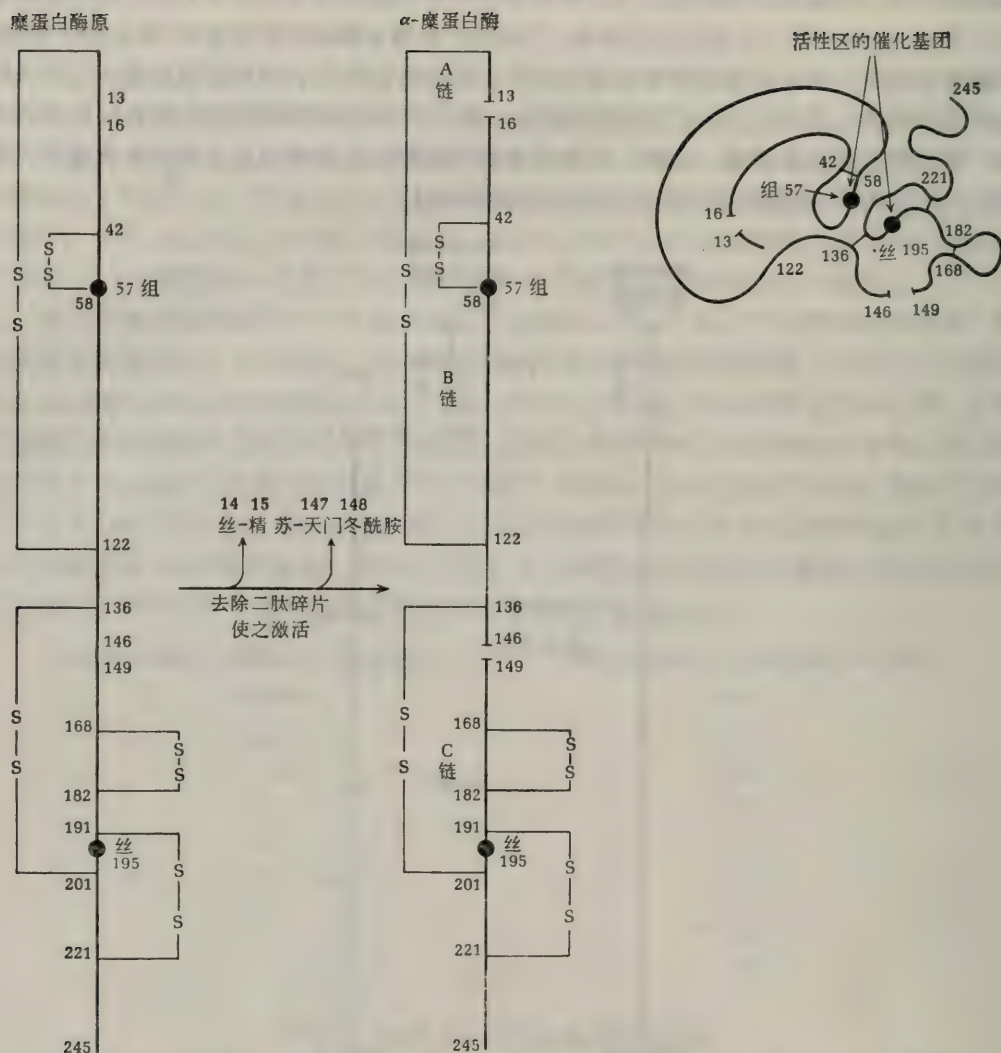


图 9-12 糜蛋白酶原转变为糜蛋白酶的示意图。在切除两个二肽(丝-精及苏-天门冬酰胺)以后,糜蛋白酶的 A、B 和 C 链仅仅通过—S—S—桥连接起来。有催化活性的残基(黑圆点)来自于两条肽链。糜蛋白酶折叠示意图,表示必需基团虽然在不同的肽链上,但又是怎样被带到活性部位上使在一起的。

显然不同。

对于游离的与结合的酶在构型上变化的意义有几种不同的观点。一种观点认为,一旦底物与活性部位以锁与钥匙的关系结合就会发生酶的构型变化,这样对底物分子会施加一种应变力。这种观点的缺点是:如果活性部位有一个刚性结构,类似锁和钥匙所表现的那样,则它不能以一种最适的方式同时与底物和可逆反应的产物相适应。为了弥补这种缺陷提出了另外一些假说。其中之一就是认为游离酶分子的活性部位既不适合于底物,也不适合于产物,而仅仅是与过渡状态分子相适合。这种观点的证据是,某些酶能由一些很类似过渡状态化合物而不是由类似游离底物分子的化合物所强烈地抑制。

另一个观点是 Koshland 的诱导契合学说,最初是用以解释酶作用中的一些反常情况。例如,许多酶都不能作用于一些比它们的底物小些的同类物。己糖激酶即能很好地说明



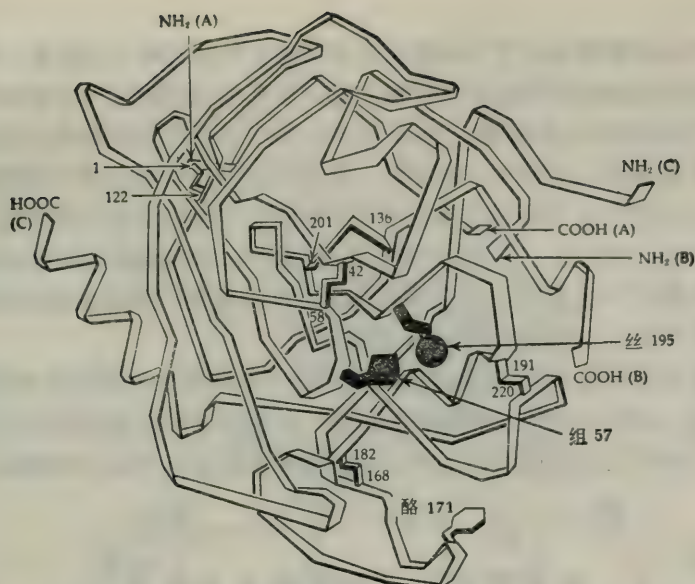
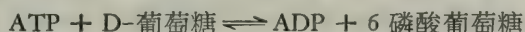


图 9-13 用X射线分析得出的糜蛋白酶多肽链骨架的三维结构模型。第 57 位上的组氨酸和第 195 位上的丝氨酸是在催化循环反应中起作用的。A, B 和 C 指三条多肽链。见图 9-12。[重绘自 B. W. Matthews, P. B. Sigler, R. Henderson and D. M. Blow, *Nature*, **214**: 652 (1967)]

这一点,它催化下列反应



由于己糖激酶能使几种不同的己糖的 6-羟基磷酸化,应能推测它也许可利用比葡萄糖小些的底物。但是己糖激酶却不能使一些较葡萄糖小的同类物磷酸化,如甘油醛及某些简单的醇(甘油、乙醇),甚至于水,由于它的分子很小在水溶液中的浓度极大,可达 55 M 左右,可以预计,它应能容易地渗入活性部位,并能起一种非常高效的接受从 ATP 来的磷酸根的受体作用。这些和其它一些考虑使得 Koshland 提出,当活性中心未被占据时,游离酶活性中心上的必需功能基并非处于它们起催化作用的最适位置,但当底物分子与酶结合时,结合的亲和力迫使酶分子构型变化,致使催化基团转变为适宜的几何位置以形成过渡状态,此即所谓的诱导契合(图 9-14)。酶分子的这种活性构型不稳定,在没有底物存在时它倾向于反回转变为游离形式。一种差的底物,即与活性部位结合亲和力低的底物,不大可能使酶分子变为最大活性形式,因为它或是太小或是空间构型不正确。这可解释为什么在己糖激酶反应中水的浓度达到 55 M 也还不能与正常的底物——葡萄糖竞争。

酶与底物分子结合时所发生的诱导构型变化也可能是酶加强反应速度的一个重要因素。它们使酶和底物都发生了变形,而且更容易进入过渡

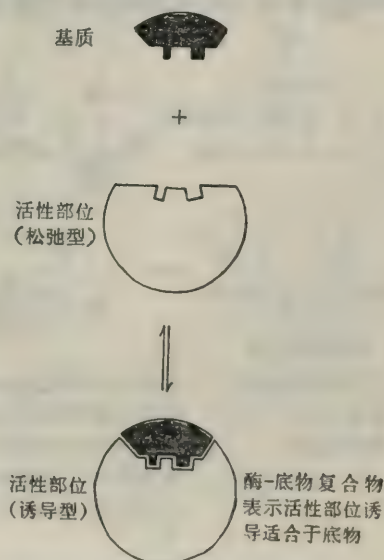


图 9-14 诱导契合学说,设想活性部位是可变的,能调节其构型以适应底物分子。

状态。

现在我们已经概略地讨论了与酶催化效率可能有关的四种主要因素,我们能否从量上更具体地来估计每种因素所起的作用呢?也许没有单独的因素可以解释所有酶的全部催化活性,很可能对于每一种酶来说,各种因素的特定联合作用才是整个反应速度加快的根源。Jencks 及其共同工作者的计算表明,靠近和定向这两个因素联合作用可能使酶反应速度增高达  $10^8$ ,此数值与某些酶的催化效率很接近。通过将底物及催化基团紧密地靠拢,以及精确地定位调整它们相互间的角度,它进行移位和转动的自由度,即熵,可以减少到足够使它们容易进入过渡状态。在酶的作用上共价催化和酸碱催化虽然都很重要,但可能对增加速度所起的作用较小,也许不超过  $10^3$ 。

除上面讨论的主要因素外,还观察到有些酶的活性部位的空腔相对来说是非极性的,因此催化基团被一种低介电效用的环境所包围。这不仅使催化基团极化而且也使底物的易感键极化,结果两者的反应活性都更活泼。这种现象也在增加某些酶促反应的总速度中起作用。

## 酶活性部位上的某些反应机理

虽然对于任一种酶的催化机理的细节还不清楚,但从动力学及特异性的研究、酶活性部位的化学分析、对某些酶结构和酶与反应迟钝的底物或竞争性抑制剂形成复合物的结构进行 X 射线分析比较等工作中,对于酶催化机理的了解已取得巨大进展。

糜蛋白酶是一个研究得较深的例子。其活性决定于第 57 位组氨酸及第 195 位丝氨酸残基,二个残基在活性部位上的位置互相靠近,而且在第 195 位丝氨酸羟基上形成一种共价的酰基酶中间产物。运用这些和其他一些知识设想糜蛋白酶水解肽键的反应机理。按照一种假说(图 9-15),第 57 位组氨酸残基的异吡唑基起了广义碱的作用。增强第 195 位丝氨酸羟基对底物的氨酰基上羧基碳原子的亲核作用,因此置换了另一个氨基酸的

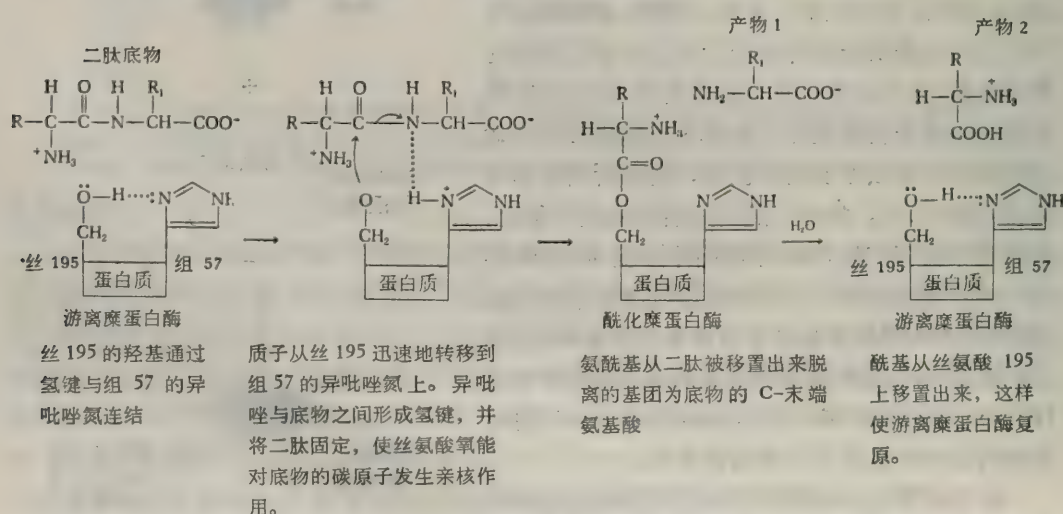
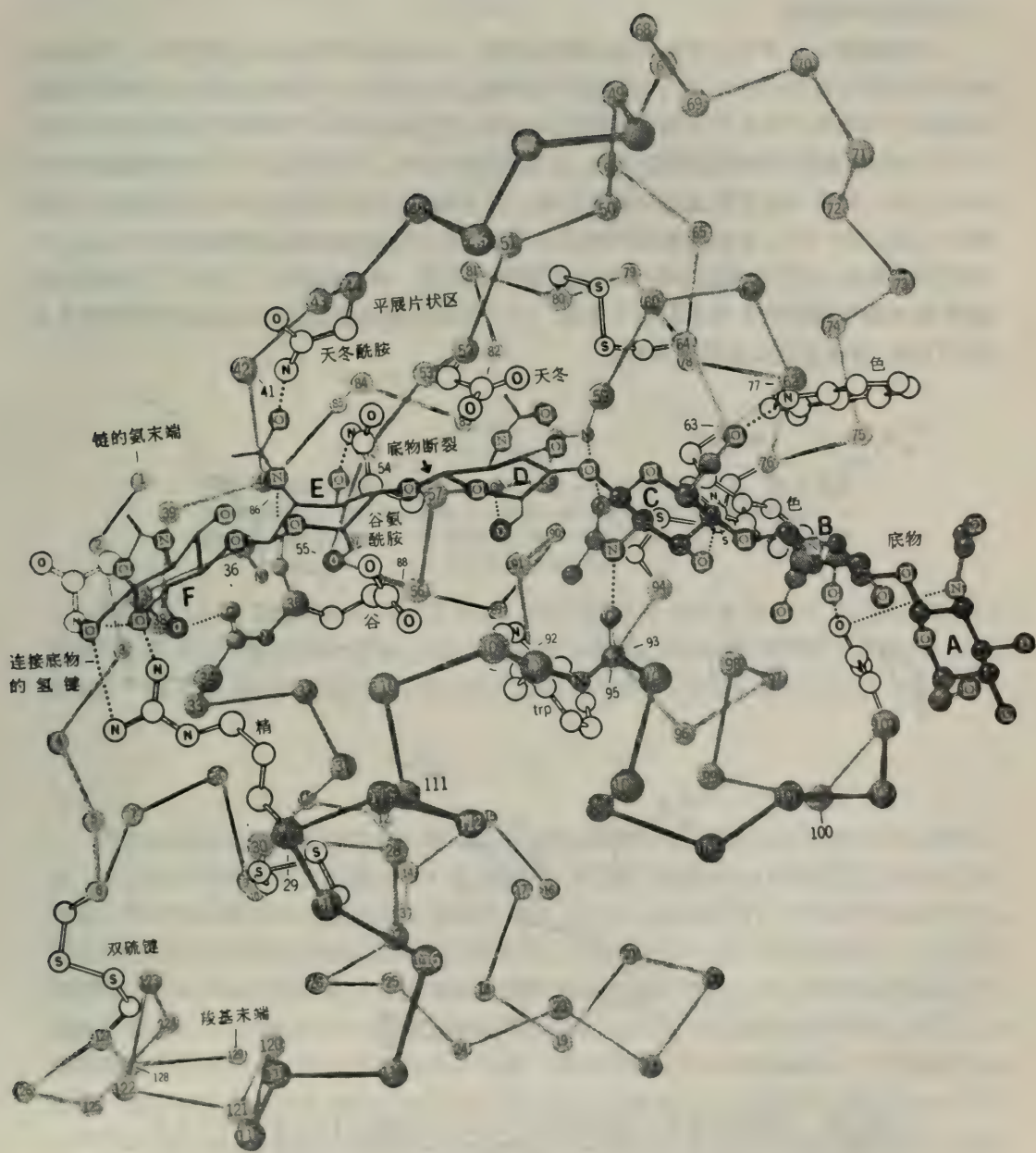


图 9-15 糜蛋白酶对二肽作用的可能机理。这只是关于共价催化学说的许多学说中的一种,无疑地它还伴随有能促进反应速度的其他作用。





A

图 9-16 A 溶菌酶-底物复合物的结构及设想的作用机理。上图表示在结晶复合物中溶菌酶的主链(开口的浅色线条)和底物分子。(深色线条)

氨基,即离去的基团,并导致第 195 位丝氨酸上羟基的氨酰基衍生物的形成。这种双置换作用的第二步也就是第一步的逆过程,在这个过程中第 57 位组氨酸的异吡唑基促使氨酰基从酶的丝氨酸羟基上转移到第二底物,即酰基受体上。这里的第二个底物是水,但也可以是一种醇、氨基酸或胺。这种反应机制(图 9-15)虽有许多证据支持,但还不足以说明糜蛋白酶的高催化率;推想在广义碱催化的亲核置换机理基础之上还有接近、定向以及张力等因素参与作用。

溶菌酶是又一种正在研究其催化机理的酶。X 射线分析结晶酶证明它有一个长的裂缝作为其活性部位(图 9-16),此裂缝可容纳其正常底物——细菌细胞壁的长链肽聚糖。溶菌酶可与结构类似正常底物的某些作用迟钝的底物或竞争性抑制剂形成酶-底物复合物;这些物质能特异地结合到裂缝内,但不受酶的作用。已经结晶出一种溶菌酶的酶-底物复合物。并用 X 光衍射方法分析其结构。可清晰地见到它的活性部使与底物分子易感键的关系(图 9-16)。最明显的是可辨认出第 35 位上的谷氨酸残基的羧基及第 52 位上天冬氨酸的氨基,它们在裂缝中位于将被断裂的键附近。像在协调的广义酸-广义碱催化机制中似乎起作用的质子供体和质子受体一样,还值得注意的是上述基团还被非极性 R 基团所包围,估计它能促进质子转移。

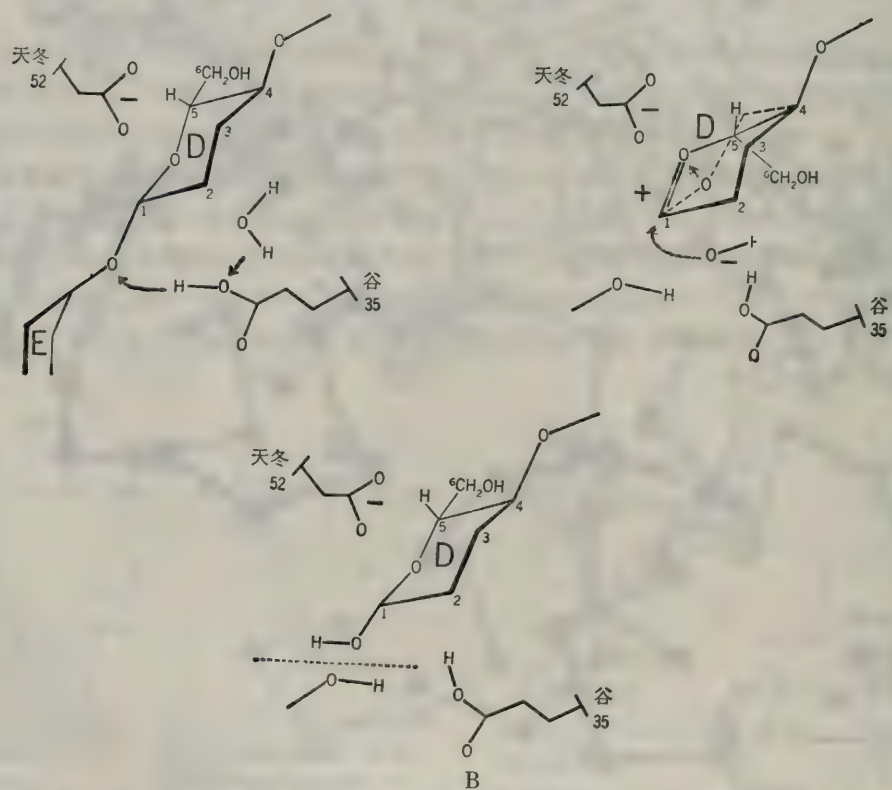


图 9-16B 上面的图象表示设想的溶菌酶作用机理,仅表示底物分子的一部份。D 环是 N-乙酰胞壁酸的一个残基,而 E 环则是 N-乙酰葡萄糖胺的一个残基。上左图中谷氨酸 35 的一个氢原子作用于两个糖基之间的糖苷氧原子。上右图 D 环碳原子成了一个碳鎓离子。邻近的 52 位天冬氨酸的羧基能稳定此离子, D 环扭曲成为半椅状构型。一个氢氧离子(来自于水分子)作用于碳鎓离子并完成裂解过程。(上底图)

羧肽酶是一种能催化肽类的 C-末端肽键水解的肽链端解酶。它具有一个穴或空腔



形式的活性部位,而多肽底物的 C-末端残基恰好可将其尾端放入穴或空腔中契合。此空腔内含有一个锌原子以及第 145 位精氨酸、第 248 位酪氨酸和第 270 位谷氨酸等残基特有的 R 基团。根据 X 射线分析推论,这些基团在活性部位的那种布局,有利于底物的 C-末端肽键发生水解。(图 9-17)

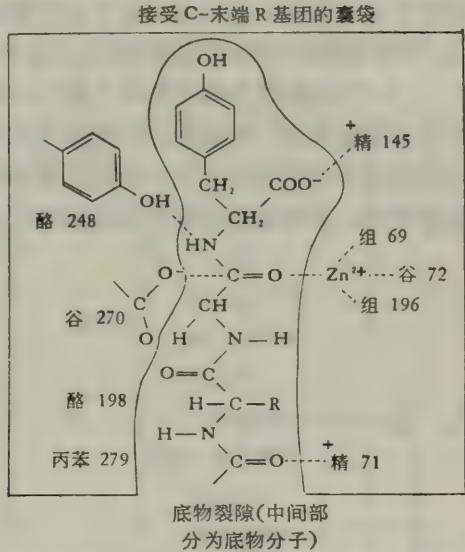


图 9-17 羧肽酶活性部位的示意图解。它由一裂缝和一囊袋构成。裂缝能容纳多肽底物的 6 个 C-末端残基;另一处囊袋则可接受 C-末端残基的 R 基团。该酶的第 248 位酪氨酸、第 145 位精氨酸、第 270 位谷氨酸与结合  $Zn^{2+}$ , 能使底物分子处于适当位置。

在结构已用 X 射线法确定的酶类中,虽然它们几乎全是水解酶,而乳酸脱氢酶则属于可催化一种有次序的双底物氧化-还原反应的细胞内酶,其结构却是现在才明确的。关于此酶的一般性质,其活性部位的结构以及设想的作用机理,均将在别处讨论。

## 调 节 酶

所有的酶类表现了形形色色的特点,这些特点显然是调节它们在活细胞中活性的因素。它们全部具有一特定的最适 pH 值,因此就可能随同细胞内 pH 的变化而改变其催化速度。所有酶促反应的速度也决定于底物浓度,后者在细胞间条件下可能有显著变动。再者,许多酶为维持其活性不是需要金属离子如  $Mg^{2+}$  或  $K^+$ , 就是需要辅酶。这点提示,细胞内这些金属离子或辅酶浓度的增减,势必具有调节酶活性的作用。然而除所有酶类的这些性质之外,有些酶还具有其他性质,从而使它们在代谢中能特异地发挥调节作用。这些特异性较高的酶类,称为调节酶类。有两大类调节酶:(1)变构酶类。它们通过一特定的代谢物在蛋白质催化部位以外的位点上进行非共价结合,来调节其催化活性;(2)共价调节酶类。它们借助于其他酶类的作用,进行有活性和无活性形式之间的相互转变。第二类中的某些酶,也对非共价的变构调节剂起反应。这两类调节酶对细胞或组织代谢状态的变动都相当敏感,其反应的时程是比较短的——变构酶类的反应时程以秒数计,而共价调节酶类则在几分钟内。我们现在将讨论这几类调节酶的情况。

## 变 构 酶

在许多多酶体系中，其反应序列的终产物可能对位于或靠近序列的开始处的一种酶起特异性抑制剂作用，因而整个反应序列的速度就决定于终产物的恒态浓度。经典的例子是催化 L-苏氨酸转变成 L-异亮氨酸的多酶系统序列，它分五个酶促反应步骤进行（图 9-18）。该序列的第一个酶——L-苏氨酸脱水酶可被终产物 L-异亮氨酸强烈抑制，但序列中的任何其他中间产物却都无抑制效应。异亮氨酸抑制作用的动力学特征是非典型性的，它与底物 L-苏氨酸既不存在竞争性的关系，又不存在非竞争性或无竞争性关系。异亮氨酸作为抑制剂具有高度特异性；其他氨基酸或有关化合物则不能抑制。这种类型的

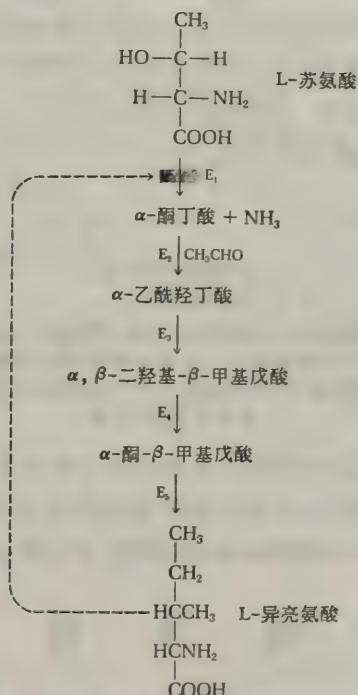


图 9-18 从苏氨酸生成异亮氨酸的反馈抑制。此反应序列的终产物异亮氨酸，可抑制第一个酶  $E_1$ （苏氨酸脱水酶）。 $E_1$ 、 $E_2$ 、 $E_3$  和  $E_5$  等表示催化中间步骤的酶。此序列中的中间代谢物（如  $\alpha$ -酮丁酸、 $\alpha$ -乙酰羟丁酸等）并不抑制  $E_1$ 。在指向被调节反应的反应箭头上，横画一黑色粗线，从终产物到此粗横线处以一虚线相连，用此表示反馈抑制。同样的标记适用于全书。

抑制作用已有多种名称，如终产物抑制、反馈抑制或逆向抑制。这种反应序列中可被终产物抑制的第一个酶，称为变构酶，这是巴黎巴斯德研究所的 Monod, Changeux 和 Jacob 等提出的名称。他们曾首先给这类调节酶的功能提出了一个综合的学说。“变构的”（allosteric）这个词，意指“别位”或“别构”；除催化部位外，变构酶还含有能被特异性效应物或调节剂可逆地和非共价地结合的“其他空间”。一般说来，变构部位在与调节剂结合时所表现的特异性，正像其催化部位为底物结合时所表现的特异性一样。有些调节剂是抑制性的，如 L-异亮氨酸之对苏氨酸脱水酶（图 9-18），因此称它们为抑制性或负调节剂。其他变构酶可能具有激动性或正调节剂。当一种变构酶只有一种特异性的调节剂时，可称它属于单



价的变构酶。而有些变构酶能对两种或多种特异的调节剂有反应，每种调节剂都可结合到酶分子上的一个特异部位，则它们属于多价的变构酶。另外，一种已知变构酶也会同时有正和负调节剂。在控制网中，可以用一个或多个多价的酶把两个或更多的多酶体系连接起来(图 9-19)，其例证将在另章介绍。(第二十三至二十六章)

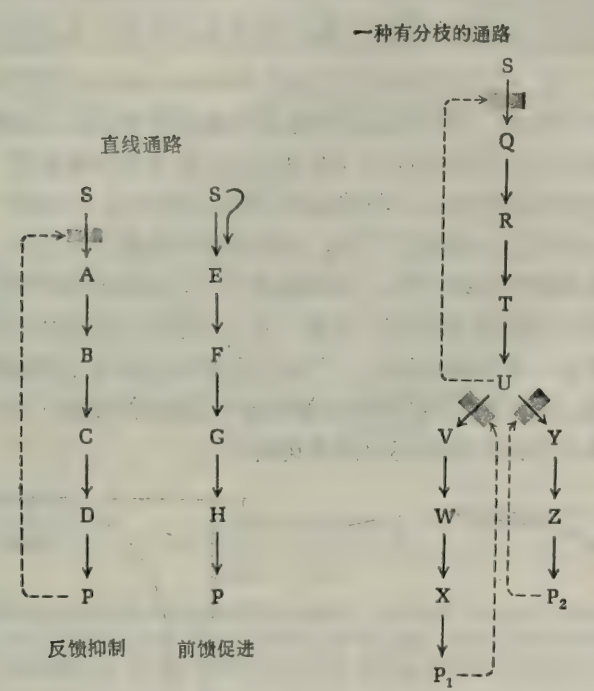


图 9-19 变构调节模式图。在直线通路，终产物一般抑制反应序列中的第一个酶。正如虚线箭头所示，有时前体 S 可能起一种正调节剂的作用，并促进第一个反应。在有分支的通路中，分支点处的代谢物经常是第一个酶的反馈抑制剂，而支路的两个终产物 ( $P_1$  和  $P_2$ ) 则常作为分叉点后的第一个酶的反馈抑制剂。

一个多酶体系的反应序列中的第一步，即被变构酶催化的那步，在细胞内的条件下通常是不可逆的。它常被称为关键反应；一旦它出现了，则该序列的全部继后反应也将会发生。显然，使细胞对一条代谢途径的第一步进行调节，这是最节省代谢物的一种好办法。

与一般的酶比较，变构酶类的分子量通常大很多，并且更复杂和较难提纯。这是因为几乎所有已知的变构酶都是低聚物，具有两条或多条多肽链亚基(一般为偶数)；而有些变构酶则含有许多多肽链。变构酶常表现出许多反常的性质。如某些酶在  $0^{\circ}\text{C}$  不稳定，但在室温或体温下却很稳定，这与单链酶类不同，因为寒冷并不引起后者的不稳定。绝大多数变构酶显示了反应初速度对底物浓度的非典型性依存关系，并且不遵守经典的 Michaelis-Menten 关系式。再者，调节性代谢物产生的抑制作用，并不经常与竞争性、非竞争性以及无竞争性抑制的单纯而熟知的原型反应相一致。

随调节分子的本质不同，变构酶表现出两种不同的控制类型——异质性的 (heterotropic) 和同变性的 (homotropic)。异质性酶类可被除底物以外的效应物或调节剂分子所激动或抑制。对异质性酶——苏氨酸脱水酶(图 9-18)而言，其底物是苏氨酸，而调节剂则是 L-异亮氨酸。另一方面，在同变性酶类，其底物也可发挥调节剂的作用。同变性酶类含

有两个或多个与底物结合的部位；这些酶的调节决定于究竟有多少底物部位被结合。然而，相当多的(即使不是大多数)变构酶都属于同变-异变性的混合型，即底物和某些其他的代谢物都可能作为它们的调节剂。

### 变构酶的动力学

由于变构性调节剂的浓度变化可使变构酶类的动力学行为发生明显改变，因此在底物浓度、 $V_{\text{最大}}$  值和  $K_M$  之间，不常常表现有经典的 Michaelis-Menten 动力学关系。许多变构酶类，尤其同变性变构酶类，其初速和底物浓度的关系常显示一S形曲线，而不是按 Michaelis-Menten 关系而产生的矩形双曲线(图 9-20)。此 S 形曲线意指：第一个底物分子与酶的结合就能促进继后的底物分子与其他底物部位的结合，正如将一个氧分子结合到血红蛋白后可促进继后氧分子的结合一样。S 形曲线的坡度有时甚陡，所以稍微增加底物浓度即可引起催化速度的显著加快，这远远超过了单纯的非调节酶遵从 Michaelis-Menten 型双曲线关系所表现的那种情况。这样一种 S 形关系，是正协作性(positive cooperativity)的一个例子，因为一个底物分子在一个部位上的结合促进了继后的分子结合于其他部位。但是必须明确，并非所有的变构酶类都表现为初速对[底物]的 S 形曲线；此外，也并非所有呈现这种 S 形曲线的酶都必定是变构酶。

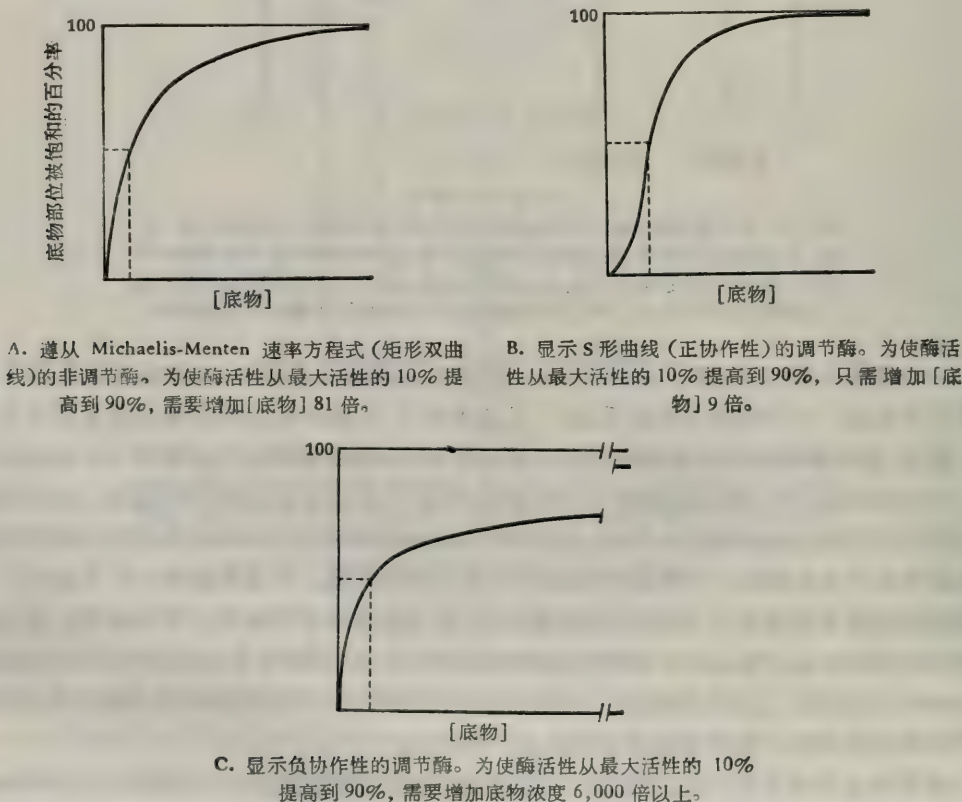


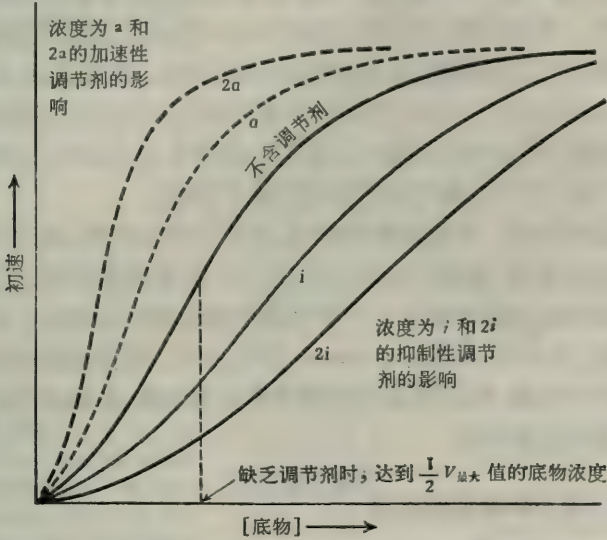
图 9-20 将底物部位的饱和百分率对底物浓度作图，并比较所绘得的理想图：(A) 一种非调节酶；(B) 一种显示正协作性的调节酶，以及 (C) 一种显示负协作性的调节酶。

有些变构酶却表现相反的行为：结合一个底物分子似乎能降低继后底物分子的结



合。此即负协作性 (negative cooperativity)，它使初速对底物浓度关系的图成了一条较平坦的曲线 (图 9-20)。在这样一种情况下，酶对底物浓度的细小的变化很不敏感，其达到饱和的速度也较非调节酶类和正协作性酶类为慢。

A. K 酶类。当提高加速性调节剂的浓度时，这些酶的反应是降低其表观  $K_M$  值；当提高抑制性调节剂的浓度时，则其反应表现为表观  $k_M$  值的增加。因此，如底物浓度固定又未饱和，于加速性调节剂存在下，反应速度会加快；而于负调节剂存在下，则反应速度会减慢。K 酶类的  $V_{\text{最大}}$  值仍维持恒定。



B. M 酶类。如图所示，在加速性或抑制性调节剂存在下，这些酶的  $V_{\text{最大}}$  值发生改变，而其表观  $K_M$  值将无变化。 $K_M$  和  $V_{\text{最大}}$  这两名词，不能严格应用于那些不遵从 Michaelis-Menten 双曲线关系的变构酶类；在这里，它们仅用来分别表示达到  $1/2$  最大速度的底物浓度和最大速度。

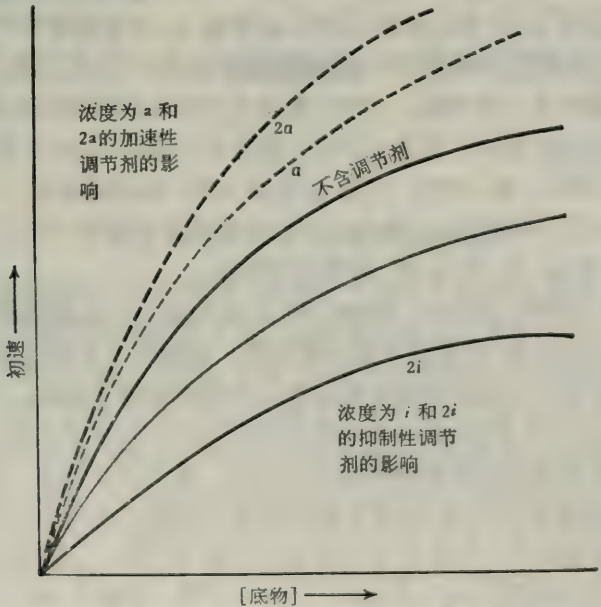


图 9-21 正(加速性)和负(抑制性)调节剂对于K和M类变构酶的初速-[底物]关系曲线的影响。

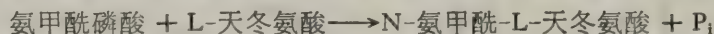
有些变构酶类对与一种调节剂结合的反应，伴有底物的表观  $K_M$  值的变化，而其  $V_{\text{最大}}$

值却无变化(图 9-20)。负调节剂将导致近似  $K_M$  值的增加,而正调节剂则引起表观  $K_M$  值降低(此处“表观  $K_M$  值”一词是用来仅仅指可达到  $1/2$  最大速度时的底物浓度;不能采用这样一个表观  $K_M$  值计算变构酶的初速,因为其初速对[底物]的关系不符合 Michaelis-Menten 假设和方程式所要求的那种矩形双曲线)。因此,负调节剂将在固定的且不饱和的底物浓度水平上降低反应速度;而正调节剂则将增加反应速度。有些变构酶对正或负调节剂的反应,伴有其表观  $K_M$  值的变化,而  $V_{\text{最大}}$  值并无改变。这些变构酶有时称为 K 酶类(图 9-21)。反之,有一些变构酶在对调节剂起反应中显示了  $V_{\text{最大}}$  值的改变,而其表观  $K_M$  值并不改变,则可称它们为 M 酶类;只有少数几例属于这一类酶,而且也不是全部变构酶都能归属于这两类中的一类。一般说来,从初速对底物浓度的关系曲线来解释变构酶类的调节特性,仅在底物浓度的较低范围内才具有生物学意义,因为在完整细胞内的代谢物的浓度,通常远较作用于它们的酶所要求的饱和水平为低。

特异性调节剂激活或抑制一种变构酶的能力,有时可使之消失,而又不损害其催化活性。常用的方法包括轻微加热,暴露于尿素中,或者用一种试剂处理酶以引起调节剂部位发生化学改变。这时酶被说成是脱敏了。一种脱敏的变构酶不仅丧失了其对调节剂的敏感性,而且竟可能表现出正常的 Michaelis-Menten 型动力学。遗传突变有时可以导致生物合成这样一种有缺陷的变构酶,即它对正常的调节剂也不敏感,推测这是由于非功能性地置换了一个关键的氨基酸残基所致。

### 天冬氨酸转氨甲酰酶: 动力学和抑制作用

虽然已知有许多变构酶类,但了解得最透的还是大肠杆菌的天冬氨酸转氨甲酰酶,常略写为 ATC 酶(ATCase, 国际酶学委员会推荐的名字是天冬氨酸氨甲酰基转移酶)。不能认为它是所有变构酶中的典型,但可以作为一类代表。ATC 酶催化下列反应:



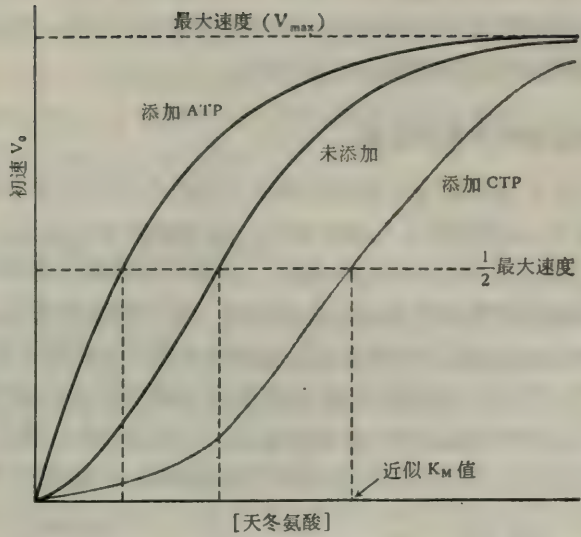
在嘧啶核苷酸——胞苷三磷酸(CTP)的酶促生物合成中,该反应是它的一个早期反应步骤,我们将在另章中进一步讨论。CTP 是这个生物合成序列反应的终产物,也是 ATC 酶的特异性负调节剂;胞苷二磷酸(CDP)和胞苷一磷酸(CMP)则不表现有活性。ATC 酶也有一个正调节剂,即 ATP。ATP 能逆转 CTP 的抑制作用。图 9-22 表示了天冬氨酸单独作用,以及有调节剂 ATP 与 CTP 存在时其浓度对 ATC 酶活性的影响。CTP 能增加该酶的表观  $K_M$  值,而 ATP 则可使其降低。

有许多人,特别是美国的 Gerhart, Pardee 和 Schachman, 以及德国的 Weber 等已将大肠杆菌的 ATC 酶分离出来,并进行了详尽的研究。此酶的分子量约为 310,000, 但通过汞试剂处理,可解离成两个相同的催化亚基和三个相同的调节亚基。在两个催化亚基中,每一个的分子量约为 100,000, 并含有三条分子量为 34,000 的多肽链,称为 C 链。每个催化亚基含有三个供底物天冬氨酸结合的结合部位,在三条 C 链中,每一条上各有一个。催化亚基具有酶促活性,但它们对调节剂 CTP 并不敏感。在三个没有催化活性的调节亚基中,每一个都含有两条分子量为 17,000 的多肽链(R 链);每条 R 链又与一个  $\text{Zn}^{2+}$  原子结合。每一调节亚基能结合两分子的调节剂——CTP, 两条 R 链中的每一条各结合一分子 CTP。

当天然 ATC 酶分子被解离成催化亚基和调节亚基的混合物时,此混合物仍保留着



将初速  $v_0$  对天冬氨酸的浓度作图。如果维持天冬氨酸的浓度在一恒定水平，大大低于其饱和浓度，添加负调节剂 CTP，由于提高了表观  $K_M$  值，故能降低该酶活性。反之，当添加正调节剂 ATP 时，由于表观  $K_M$  值降低，可使该酶活性增强。



天冬氨酸转氨酶的亚基结构示意图。用  $Hg^{2+}$  处理时，该酶即解离成两个三聚体的催化亚基和三个二聚体的调节亚基（黑色圆圈）。这些还能进一步解离，总共可得到六个单体的 C 链和六个单体的 R 链。每个亚基可能以两种构象存在，现以小圆（○）和小方块（□）表示。小圆代表 ATC 酶的活性构象；而小方块则代表由 CTP 同调节亚基结合而诱发的失活构象。

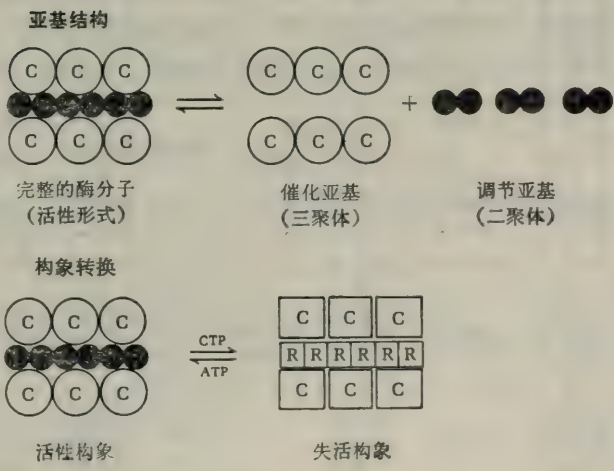


图 9-22 天冬氨酸转氨酶的性质。

催化活性。但是只要催化亚基和调节亚基处于相互分离状态，酶促反应就不会被 CTP 抑制。为使 CTP 引起的抑制作用发生，催化亚基和调节亚基必须以物理方式缔合在完整低聚体的 ATC 酶分子内。因此，CTP 与调节亚基结合可降低缔合的催化亚基的酶活性。我们相信，此信号是经由一种构象变化而传递的；认为 CTP 结合到调节亚基的特定部位时该亚基将发生构象改变，这再经空间传达到催化亚基。于是，催化亚基也依次进行一次协调性构象转变，从有催化活性的构象变成在相同底物浓度下活性不高的另一种构象。图 9-22 总结了 ATC 酶的动力学行为以及负效应物 CTP 和正效应物 ATP 通过协调性构象变化对该酶的调节。有些变构酶类的底物和调节剂的结合部位分布在不同的亚基上，ATC 酶可作为它们的代表。在其他一些变构酶中，这两种部位可分布在同一亚基上。还有另一些变构酶类似乎只含有单条多肽链。

ATC 酶以及其他变构酶的重要特征之一，在于其变构调节的方式具有种属特异性。

虽然大肠杆菌和某些其他细菌的 ATC 酶可被 CTP 强烈地抑制,并被 ATP 激动,而动物组织中相应的 ATC 酶却不受这些核苷酸的影响。得自不同种属生物的同系变构酶,可能具有迥然不同的变构性调节剂。

### 变构酶的调节作用的机理

在关于调节剂与一种变构酶调节部位的结合怎样会改变其催化部位的活性的分子机理问题上,人们集中了大量注意力。变构酶类和血红蛋白在功能上的惊人相似,开辟了一条最有成效的研究和探索的途径。这里应特别举出两者的相似处表现在:一方面,于某些变构酶的底物浓度和初速之间存有一种 S 形曲线关系,而另一方面,在氧浓度(即氧分压)和氧同血红蛋白的结合之间也存有这样的 S 形曲线关系。

我们已经知道,对血红蛋白亚基的协调性相互转变作用已提出了两种模型,即 Koshland 提出的序列模型和 Monod 及其同工提出的对称模型。对某些含有多个亚基,而这些亚基又假定以两种不同构象出现的变构酶类,这些模型也可以应用。图 9-23 表明把这些

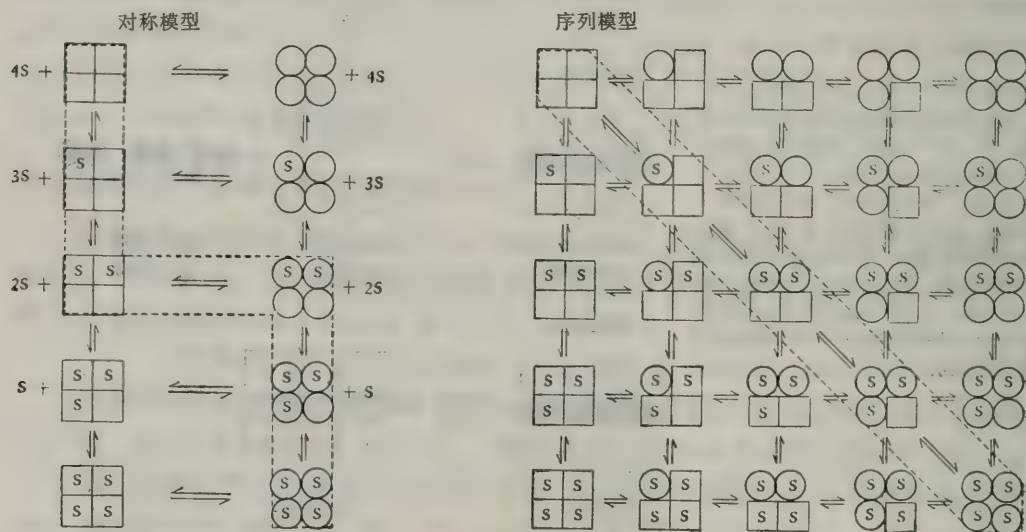


图 9-23 变构酶类进行活性形式与失活形式相互转变的两种模型。在对称模型或“全或无”模型(也可参阅图 6-23),假设所有亚基都是同样的构象,即不是□就是○。配体 S 的逐步结合,有利于亲和力较强的○型,其可能的途径用虚线部分表示。在序列模型,每个亚基将以低聚蛋白质的□型或○型存在。因此,可能组成极多数目的构象,但对角线方向用虚线表示的途径却是最可能的路线。[引自 D. E. Koshland, Jr., in P. D. Boyer (ed.), *The Enzyme*, 3rd ed., vol. 1, 1970]

模型用于一种含有四个亚基的同变性变构酶类的情况。它的每个亚基能结合一个底物分子,而在底物浓度与酶活性之间又存有 S 形曲线关系(参阅图 9-20)。根据对称模型,第一个底物分子的结合将引起“全或无”(或对称性)效应,从而提高其余亚基对底物的亲和力。所谓“全或无”效应,是指全部亚基不是以低亲和力形式就是以高亲和力形式存在(图 9-23)。

序列模型也假设催化亚基有两种构象状态,但又假设它与对称模型不同,因其亚基的构象可能进行逐个有顺序的变化;在全有和全无状态之间,酶分子可能有许多中间构象状态存在,每种构象都具有它固有的催化作用(图 9-23)。所以对变构酶活性的调整或调

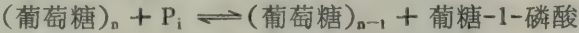


节,序列模型提供了可能较对称模型更为精细的作用。

关于各种变构酶类特有的调节和动力学,已经提出了其他类型的模型进行解释。有些研究者认为,目前还没有找到一个单一的模型能解释所有变构酶类的行为,而其他研究者却支持用单一的模型就足够解释的观点。为解释某些变构酶类的非常复杂的动力学行为,有人假设其亚基经历了甚为缓慢的构象的相互转变作用。

## 共价调整的调节酶类

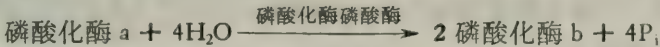
在第二类调节酶,通过其他酶的催化以共价方式修饰它们的结构,就能使调节酶的活性形式与失活形式相互转变。这类调节酶的经典例子是动物组织的糖原磷酸化酶。它催化储存多糖——糖原(一种葡萄糖的多聚物)的分解,以生成葡萄糖-1-磷酸。



糖原

缩短了的糖原分子

此酶的生物学功能将在另章讨论。它以两种形式出现,即活性较强的形式——磷酸化酶 a 与活性较弱的形式——磷酸化酶 b。磷酸化酶 a 是一种由四个大亚基组成的低聚蛋白质(图9-24)。每个亚基含有一个其羟基已被磷酸化了的丝氨酸残基。这些磷酸基团是酶的最大催化活性所需要的。有一种酶——磷酸化酶磷酸酶,能通过水解脱去磷酸化酶 a 分子中的磷酸基。



脱去磷酸基后,使磷酸酶 a 解离成两个半分子——磷酸化酶 b,后者裂解糖原的催化

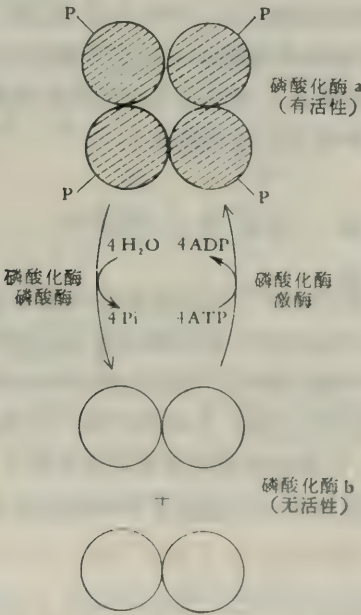
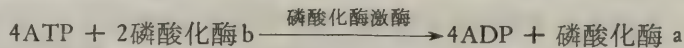


图 9-24 共价修饰对糖原磷酸化酶活性的调节。该酶的活性形式——磷酸化酶 a (一种四聚体), 可被磷酸化酶磷酸酶经酶促反应脱去磷酸, 生成了失活的磷酸化酶 b (一种二聚体)。在磷酸化酶激酶的作用下, 靠消耗 ATP 完成了四个特定丝氨酸残基的磷酸化, 从而使磷酸化酶 a 再生。

活性远低于磷酸化酶 a。

相对无活性的磷酸化酶 b, 能被一种酶——磷酸化酶激酶再活化, 以生成磷酸化酶 a, 而磷酸化酶激酶需要消耗 ATP, 可催化丝氨酸残基的酶促磷酸化作用:



这样, 通过两种酶的作用以改变有活性与无活性形式之间的平衡, 从而调节了糖原磷酸化酶的活性 (图 9-24)。

在糖原磷酸化酶和由共价修饰进行调节的类似的调节酶, 它们的第二个突出的特性就是能使一个化学信号显著放大。虽然所有的酶都能引起极大效应, 即在一定时间内一个酶分子能从一已知的底物催化生成几千个产物分子。但是在这里, 一种酶系将另一种酶作为其底物而起作用。一分子的磷酸化酶激酶能转变几千个无活性的磷酸化酶 b 分子成为有活性的磷酸化酶 a, 后者再催化糖原生成几千个葡萄糖-1-磷酸分子。因此, 磷酸化酶激酶和磷酸化酶组成了一种两级的放大级联 (amplification cascade)。我们将在本书中另章述及, 这两种酶实际上是一具有两个继续放大级的较长级联中的“单元”, 它们的生物学功能是, 把由少数激素(肾上腺素)分子所产生的极小信号放大成有相当大量的组织糖原分解的效应。

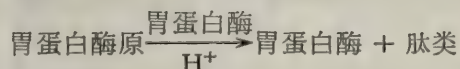
迄今为止, 已知共价调节的酶类包括两类化学修饰。磷酸化酶和某些其他酶类的调节是, 从 ATP 转移一个磷酸基到它们分子上, 以生成一种磷酸酶。另一类共价修饰则通过从 ATP 转移一个腺苷酰基到酶分子上而实现, 如见于大肠杆菌谷氨酰胺合成酶的调节。此酶催化下列反应:



在谷氨酰胺合成酶, 如将腺苷酰基从 ATP 转移到该酶 12 个亚基中每一亚基所含特定的酪氨酸残基上, 使生成酪氨酸酚羟基的共价腺苷酰基衍生物, 这样就能把活性较大的谷氨酸合成酶变成活性较弱的形式。该酶也可以经酶促脱腺苷酰作用再变成其活性形式。关于这酶的复杂的调节特性将在另章详述。

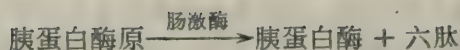
## 酶原的共价激活

另一类型的酶活性调节稍有不同, 它是酶类的无活性前体(即酶原)经酶促激活作用而生成具催化活性的形式。其经典例子是胃蛋白酶、胰蛋白酶和糜蛋白酶等消化酶类, 它们分别以无活性的酶原——胃蛋白酶原、胰蛋白酶原和糜蛋白酶原等合成出来。当这些酶原分泌入胃肠道时, 通过酶原分子中一个或多个特定肽键的选择性水解断裂, 就可以变成它们的活性形式。在胃内, 胃蛋白酶原经游离胃蛋白酶于低 pH 下作用, 可变成有活性的胃蛋白酶。这一激活作用从胃蛋白酶原的 N 末端以肽类混合物的形式脱下 42 个氨基酸残基:

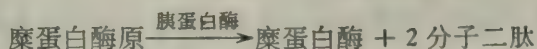


在肠激酶的作用下, 从胰蛋白酶原的 N-末端脱去一个六肽, 就能将它变成有活性的胰蛋白酶:





如以前所述,通过胰蛋白酶的作用,从糜蛋白酶原脱下两个二肽碎片,可使它变成有活性的糜蛋白酶:

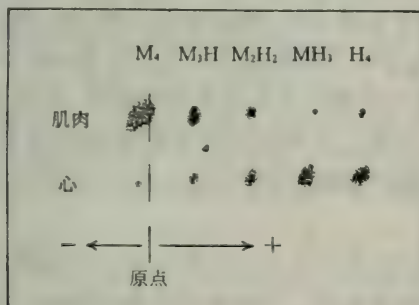


只要这些酶原停留在它们被制造出来的细胞内,就能避免它们对细胞内蛋白质发挥蛋白水解作用。只是当它们被分泌入胃肠道以后,才转变为活性形式。然而这类型的共价调节是单方向的:还没有已知的酶反应能将这三种酶逆向转变成它们各自的酶原。

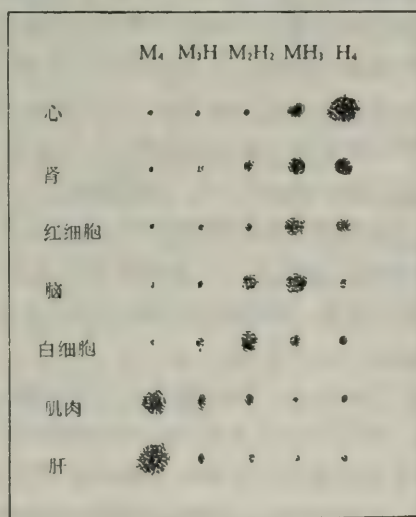
## 同 功 酶

代谢活动的另一类型调节是通过同功酶类的参加而实现的,它们是存于单一种属生物或甚至单个细胞内的一已知酶的多种形式。这样的多种形式可以用细胞抽提物进行凝胶电泳加以检出和分离;因为它们是由不同的基因所编码,其氨基酸组成各异,所以其等电点的 pH 值也不同。

乳酸脱氢酶是这类酶中首先被深入研究过的酶类之一。在大鼠和其他脊椎动物的组织中,它以五种不同的同功酶出现(图 9-25)。大鼠的所有这些同功酶都已被分离,它们都能催化同一个总反应:

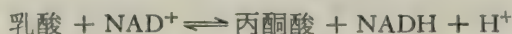


采用区带电泳分离大鼠骨骼肌和心脏的同功酶类。抽提液点样在“原点”线上。四个同功酶泳向阳极,另一个泳向阴极。斑点的大小和密度,反映了每种同功酶的含量。[重绘自 H. I. Fine, N. O. Kaplan and P. Kufitinec, et al. *Biochemistry*, 2:116 (1963)]



人类组织中乳酸脱氢酶的同功酶的相对含量。血-血清的同功酶水平测定可用于临床诊断;患肝病时, H<sub>4</sub> 和 MH<sub>3</sub> 同功酶含量升高。

图 9-25 乳酸脱氢酶的同功酶



在上式中,  $\text{NAD}^+$  和  $\text{NADH}$  分别代表氧化型和还原型的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸。所有这五种同功酶的分子量相同,约为 134,000,均含有四条多肽链,每条链的分子量为 33,500。这五种同功酶是由两类不同的多肽链(称为 M 链和 H 链)进行五种不同的组合而构成。主要存在于骨骼肌中的同功酶,含有四条同样的 M 链,现以  $\text{M}_4$  表示;另一种主要存在于心脏,含有四条相同的 H 链,以  $\text{H}_4$  表示。其余三种同功酶的组成则为  $\text{M}_3\text{H}$ 、 $\text{M}_2\text{H}_2$  和

MH<sub>3</sub>。单一的M及H链已被分离提纯,并发现其氨基酸含量和顺序均有显著差异。当以适当的比例将无酶活性的单一的M和H链混合时,可以在试管内自发地形成乳酸脱氢酶的全部各种同功酶,并全都显示充分的催化活性。

遗传学研究表明,乳酸脱氢酶的两条不同多肽链M和H的氨基酸顺序是由两种不同的基因编码的。两类多肽链的生物合成以及在一种已知细胞内乳酸脱氢酶同功酶的相对含量都受遗传调节。图9-25表明,乳酸脱氢酶的同功酶在不同组织中以不同的比例存在着。而且,在胚胎发育过程中,乳酸脱氢酶的同功酶在一种组织内的相对比例可能会发生变化。它们对心脏和肝脏疾病的诊断也很重要。(图9-25)

关于乳酸脱氢酶的同功酶,有人进行了仔细的动力学研究。结果揭示,虽然这些酶都可催化同一种反应,但它们作用于底物(尤其作用于丙酮酸)的 $K_M$ 值,以及当用丙酮酸作底物时测得的 $V_{\text{最大}}$ 值均有显著差异。骨骼肌和胚胎组织所特有的同功酶M<sub>4</sub>作用于丙酮酸时具有较低的 $K_M$ 值,而它使丙酮酸还原成乳酸的反应速度却较快。心脏和其他红色肌肉所特有的同功酶H<sub>4</sub>,其作用于丙酮酸的 $K_M$ 值较高,并且还原丙酮酸的速度较低。另外,同功酶H<sub>4</sub>催化的乳酸脱氢作用,可被丙酮酸强烈抑制。乳酸脱氢酶的其他同功酶在动力学性质上介于同功酶M<sub>4</sub>和H<sub>4</sub>之间,其差异与各酶中M和H链的相对含量成正比。

当与同功酶M<sub>4</sub>和H<sub>4</sub>占优势的组织的代谢特征比较,上述这些动力学特性有助于了解乳酸脱氢酶的同功酶功能。骨骼肌和胚胎组织表现了在无氧条件下利用葡萄糖的趋势,并能在糖酵解过程中分解葡萄糖以生成乳酸。乳酸脱氢酶可催化糖酵解的最后一步——将丙酮酸还原成乳酸。乳酸脱氢酶的骨骼肌或M<sub>4</sub>同功酶,具有作用于丙酮酸的低 $K_M$ 值和高 $V_{\text{最大}}$ 值,因此它完全适合于将丙酮酸迅速转变成乳酸。另一方面,心肌不能正常地从葡萄糖生成乳酸;在有氧条件下,它却将丙酮酸氧化成CO<sub>2</sub>,而不通过乳酸的中间生成阶段。由于同功酶H<sub>4</sub>\*作用于丙酮酸的 $K_M$ 值很高,它将丙酮酸还原成乳酸的 $V_{\text{最大}}$ 值又低,加以它还会被过量的丙酮酸抑制,而这些因素均可大大减弱其乳酸生成的活性,故同功酶H<sub>4</sub>对葡萄糖代谢的这一不同途径是完全适应的。虽然心肌通常并未在葡萄糖的氧化中利用乳酸脱氢酶,但在氧供应很少的紧急状态,乳酸脱氢酶的存在可使心脏从糖原转化为乳酸的反应中获取能量。

现在已知许多不同的酶类都有同功酶。它们一般是由各类多肽链紧密缔合的混合物所组成。每类型的多肽链所赋与的特殊动力学及结合性质,则融合在此混合物中。许多变构酶类可以两种或多种同功酶的形式存在,而这些同功酶对其变构调节剂的敏感性各不相同。在其他情况,各种同功酶分布在细胞内不同的隔室中。

在细胞分化和形态发生的分子基础研究工作中,同功酶的研究已发展成带有根本性意义的领域之一。不仅是那些具有催化作用的蛋白质,细胞内的许多蛋白质都可能以多种形式出现。

## 摘 要

酶类的活性部位能用下述方法阐明: 研究酶类的底物特异性; 选用能引起催化所必

\* 原书误印为 M<sub>4</sub>——校者注



需的功能基发生共价修饰的特异性化学试剂;亲和标志;以及用X射线分析酶-底物或酶-抑制剂复合物的结晶。在活性部位的催化作用中,常涉及酶蛋白的丝氨酸、组氨酸、赖氨酸和半胱氨酸的R基团。

酶催化的反应较相应的非催化反应快 $10^8$ 至 $10^{20}$ 倍。提高反应速度的主要原因可能是由于底物的正确取向能使之恰当地靠近和定位于酶的催化基团上,因此它容易进入过渡状态。而某些酶类反应速度的提高,在较小程度上则是由于发生了共价催化。在此过程中,有一种共价的酶-底物化合物迅速生成并迅速被分解。居于酶活性部位的供给质子和接受质子基团,可以促进广义的酸催化或广义的碱催化,从而也可能使酶反应速度加快。反应速度的提高,或许还来自酶与底物结合时出现的构象改变,但其反应加快的程度尚不清楚。少数酶类(如糜蛋白酶和溶菌酶)的作用机理已开始被了解。

在生物学上,有些酶适合起调节作用,也适合起催化作用。与某些特定的代谢物进行非共价结合,可以调节变构酶类的活性。这些酶一般催化多酶体系序列的第一个反应,并常被反应序列的终产物所抑制,而后者又是与酶分子上的特定调节部位或变构部位相结合。有些变构酶类能被其调节剂激活,这些调节剂或许就是底物本身。变构酶类显示非典型的动力学行为,即看来不符合经典的Michaelis-Menten速度方程式。将某些变构酶类的反应初速对其底物浓度作图,可绘得一S形曲线,而其他变构酶则显示非矩形双曲线。当调节剂分子与其特定部位结合时,可改变酶的表观 $K_M$ 值或 $V_{\text{最大}}$ 值。几乎所有已知的变构酶类都含有多个亚基。在某些情况,含有两类亚基——催化亚基和调节亚基。已提出几种模型来解释变构调节的作用机理。对称模型认为,变构酶分子仅以两种可能的构象中的一种形式存在,即不是有活性构象就是无活性构象。而序列模型则设想,亚基是依次而非同时改变其构象,因此也出现了具有不同催化活性的各种中间状态。

另一类调节酶可经受活性形式与失活形式之间的相互转变,这是由于其他酶能使调节酶分子上某些特定基团发生共价修饰所致。糖原磷酸化酶就是一例。如将此酶的磷酸化丝氨酸残基进行酶促水解,并使其四聚体结构解离为二聚体形式,就能转变此酶成无活性的b型。而通过酶促磷酸化作用又能将二聚体形式返回变成有活性的磷酸化酶a。

在一个已知种属或细胞类型之内,某些酶类可能出现多种形式,称为同功酶。它们含有以不同比例组合的两种或多种多肽链,从而导致各型同功酶的 $K_M$ 值或 $V_{\text{最大}}$ 值互不相同。

## 参 考 文 献

有关酶的其他参考文献,已附于第八章末。

### 书籍

- Bruice, T. C., and S. J. Benkovic: *Bioorganic Mechanisms*, 2 vols., Benjamin. Menlo Park, Calif., 1966. Comprehensive review of organic model reactions for various types of enzymes.
- Jencks, W. P.: *Catalysis in Chemistry and Enzymology*, McGraw-Hill, New York, 1969. A definitive treatment of catalytic mechanisms.

### 论文

- Bell, R. M., and D. E. Koshland, Jr.: "Covalent Enzyme-Substrate Intermediates," *Science*, 172: 1253—1256 (1971). A brief analysis of covalent catalysis and a list of 60 enzymes in which covalent enzyme-substrate intermediates are probably formed.
- Blow, D. M., and T. A. Steitz: "X-Ray Diffraction Studies of Enzymes," *Ann. Rev. Biochem.*, 39: 63—100 (1970).
- Bruice, T. C.: "Proximity Effects and Enzyme Catalysis," pp. 217—280 in P. D. Boyer (ed.), *The*

- Enzymes*, 3d ed., vol. 2, Academic, New York, 1970.
- Holzer, H., and W. Duntze: "Metabolic Regulation by Chemical Modification of Enzymes," *Ann. Rev. Biochem.*, 40: 345—374 (1971).
- Jacobson, G. R., and G. R. Stark: "Aspartate Transcarbamylases," in P. D. Boyer (ed.), *The Enzymes* 3d ed., vol. 9, pt B, Academic, New York, 1973.
- Jencks, W. P.: "Approximation, Chelation, and Enzymic Catalysis," *PAABS Rev.*, 2: 235—319 (1973). An important review and collection of original papers on orientation, orbital steering, and the catalytic power of enzymes.
- Jencks, W. P., and M. I. Page: "On the Importance of Togetherness in Enzymatic Catalysis," in *Enzymes: Structure and Function, Proc. 8th FEBS Meet., 1972*, American-Elsevier, New York.
- Kiefer, H. C., W. I. Congdon, I. S. Scarpa, and I. M. Klotz: "Catalytic Accelerations of  $10^{12}$ -fold by an Enzyme-like Synthetic Polymer," *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 69: 2155—2159 (1972).
- Kirsch, J.: "Mechanism of Enzyme Action," *Ann. Rev. Biochem.*, 42: 205—234 (1973).
- Koshland, D. E., Jr.: "The Molecular Basis for Enzyme Regulation," pp. 341—396 in P. D. Boyer (ed.), *The Enzymes*, 3d ed., vol. 1, Academic, New York, 1970. Theory and models of allosteric regulation.
- Koshland, D. E., Jr.: "Protein Shape and Biological Control," *Sci. Am.*, 229: 52—64 (1973). A well-written, easily understood analysis of the significance of conformational changes in enzyme catalysis and its regulation.
- Koshland, D. E., Jr., G. Nemethy, and D. Filmer: "Comparison of Experimental Binding Data and Theoretical Models in Proteins Containing Subunits," *Biochemistry*, 5: 365—387 (1966). The sequential and symmetry models compared.
- Lienhard, G. E.: "Enzymatic Catalysis and Transition-State Theory," *Science*, 180: 149—154 (1973). The importance of the enzyme in inducing and binding the transition-state species.
- Monod, J., J. Wyman, and J.-p. Changeux: "On the Nature of Allosteric Transitions: A Plausible Model," *J. Mol. Biol.*, 12: 88—118 (1965).
- Panagou, D., M. D. Orr, J. R. Dunstone, and R. L. Blakley,; "A Monomeric Allosteric Enzyme with a Single Polypeptide Chain: Ribonucleotide Reductase of *L. leichmannii*," *Biochemistry*, 11: 2378—2388 (1972).
- Quioco, F. A., and W. N. Lipscomb: "Carboxypeptidase A: A Protein and an Enzyme," *Adv. Protein Chem.*, 25: 1—59 (1971). A comprehensive account of the amino acid sequence, x-ray analysis, and mechanism of action.
- Segal, H. L.: "Enzymatic Interconversion of Active and Inactive Forms of Enzymes," *Science*, 180: 25—32 (1973).
- Shaw, E.: "Chemical Modification by Active-Site-Directed Reagents" pp. 91—147 in P. D. Boyer (ed.), *The Enzymes*, 3d ed., vol. 1, Academic, New York, 1970.
- Stadtman, E. R.: "Mechanisms of Enzyme Regulation in Metabolism," pp. 397—459 in P. D. Boyer (ed.), *The Enzymes*, 3d ed., vol. 1, Academic, New York, 1970.

[袁恬莹、卢义钦译 朱定尔校]



## 第十章 糖类、储存多糖和细胞壁

碳水化合物或糖类最简单的定义为多羟醛或酮以及它们的衍生物。很多具有  $(\text{CH}_2\text{O})_n$  的实验式,故起初认为他们是碳的“水化物”。简单的糖是由单个的多羟醛或酮单位构成,也称单糖,最丰富的单糖是六碳的 D-葡萄糖,它是单糖的母体,大多数其他单糖都是由它衍生出来的,对大多数生物来说, D-葡萄糖是主要的燃料分子,它也是含量最丰富的多糖类如淀粉和纤维素的基本组成成分。

低聚糖 (Oligo 来自希腊文“少”的意思)含有两个至十个单糖单位,彼此以糖苷键相连接。多糖则含有由很多单糖单位连接成直线的或有分枝的长链,大多数多糖含有仅仅一种或两种交替出现的单糖单位。

多糖有两个重要的生物功能,即作为燃料的储存形式和组织上的成分,在生物界,糖类大概比所有其他有机物质加在一起还要多,这是由于 D-葡萄糖的两种聚合物:淀粉和纤维素大量地存在于植物界所致。淀粉是大多数植物主要的燃料储存形式,纤维素则为植物的硬细胞壁和纤维状及木质组织的主要细胞外结构成分。糖原在结构上与淀粉相似,是动物体内的主要储存糖类,其他多糖则作为细菌细胞壁和动物组织的软细胞外膜的主要成分。

### 单 糖 类

单糖的实验式是  $(\text{CH}_2\text{O})_n$ , 此处  $n = 3$  或更大数值。普通单糖的碳骨架是不分枝的,除了在一个碳上为羰基氧外;其余每个碳原子上有一个羟基,羰基氧常是以缩醛或缩酮键结合的。如果羰基是在链的末端,此单糖便是醛的衍生物而称为醛糖;如果它是在任何其它位置,则此单糖是酮的衍生物而称为酮糖。最简单的单糖是三碳的丙糖:如甘油醛和二羟丙酮(图 10-1)。甘油醛是一种丙醛糖,二羟丙酮是一种丙酮糖。在单糖类里还有丁糖(四碳)、戊糖(五碳)、己糖(六碳)、庚糖(七碳)和辛糖(八碳),其中每种又有两个系列存在着,如丁醛糖和丁酮糖、戊醛糖和戊酮糖、己醛糖和己酮糖等、D-醛糖和 D-酮糖的结构式列出如图 10-2 和 10-3,在两类单糖中,己糖均远比其他糖丰富,然而戊醛糖是核酸和各种多糖的主要成分,丙糖和庚糖的衍生物是糖代谢的中间产物。所有简单的单糖都是白色结晶固体,能任意溶解于水,但不溶于非极性溶剂,大多数具有甜味。

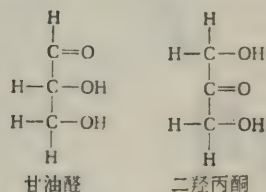


图 10-1 丙糖

### 单糖的立体异构现象

所有的单糖除二羟丙酮外,均含有一个或更多的不对称碳原子,因而是“手样”(chiral)

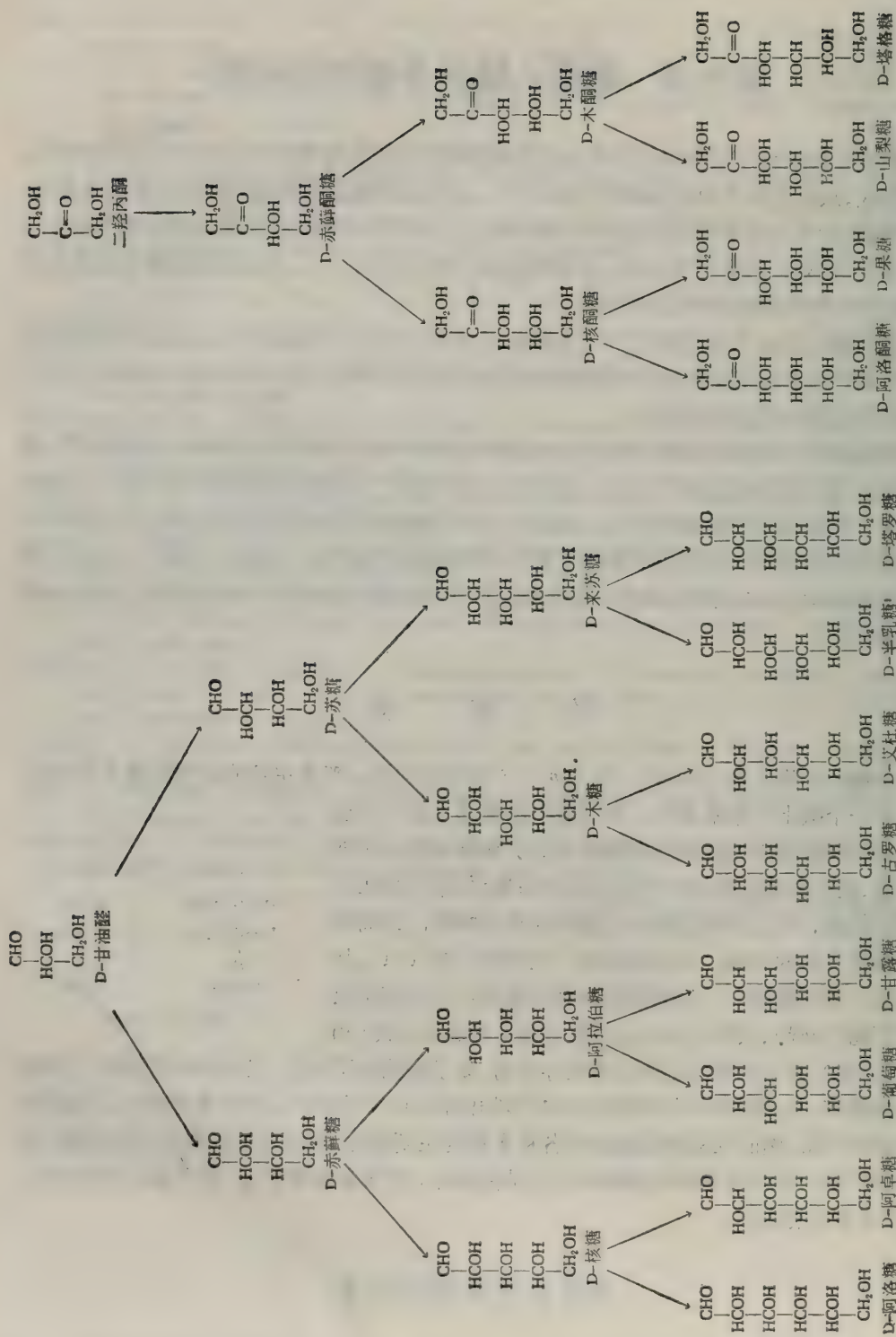


图 10-2 以开链结构式表示出从三碳原子到六碳原子的 D-醛糖系, 为了节约空间, 在本图及以后的图上都不把水平键表示出来, 但应该把这些糖的表象看作是它们的投影结构。

图 10-3 D-酮糖(开链型)



分子,甘油醛仅含有一个不对称碳原子,因此可以有两个不同的立体异构物(图 10-4)。回忆 D-和 L-甘油醛,是用以标明所有立体异构物的绝对构型的参照物或母体物。丁醛糖有两个不对称碳原子而戊醛糖有三个。己醛糖有四个不对称碳原子,因此就存在有  $2^n = 2^4 = 16$  种不同的立体异构物,其中八种已列出于图 10-2。像预料的那样,带不对称碳原子的单糖是具有旋光活性的,例如自然界存在的一般葡萄糖是右旋性的 ( $[\alpha]_D^{20} = +52.7^\circ$ ),而一般果糖却是左旋性的 ( $[\alpha]_D^{20} = -92.4^\circ$ ),但是由于它们的绝对构型都和 D-甘油醛有关,所以这两者都属于 D-系糖,对于那些具有两个或更多不对称碳原子的糖,习惯上这 D-或 L-字头是指离羰基碳原子最远的不对称碳原子的。

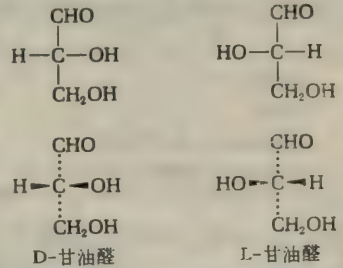


图 10-4 甘油醛的立体异构物  
显示投影结构式(上)和透视结  
构式(下)

图 10-2 显示 D-醛糖类的投影结构式,它们那离羰基碳原子最远的不对称碳原子上都有同样的构型,但是由于大多数有两个或更多的不对称碳原子,故存在若干 D-醛糖的同分异构物,其中生物学上最重要的是 D-甘油醛, D-核糖、D-葡萄糖、D-甘露糖和 D-半乳糖。

图 10-3 表示 D-酮糖类的投影结构式,在离羰基最远的不对称碳原子上也都有共同的构型,酮糖常常是在其相应的醛糖名称中插入“ul”来命名,例如 D-核酮糖 (D-ribulose) 是与戊醛糖 D-核糖 (D-ribose) 相对应的一种戊酮糖。在生物学上最重要的酮糖是二羟丙酮、D-核酮糖和 D-果糖。

L-系的醛糖和酮糖是其对方 D-系物的镜影,如图 10-5 所示, L-糖在自然界虽亦有发现,但它们不像 D-糖那样丰富,其中最主要的是 L-岩藻糖、L-鼠李糖和 L-山梨糖。

两种糖仅仅围绕某一个特定的碳原子在构型上有差异,则称为相互的差向异构体 (epimers),这样,就碳原子 2 而言, D-葡萄糖和 D-甘露糖是差向异构物,而就碳原子 4 而论, D-葡萄糖和 D-半乳糖是差向异构物。(见图 10-2)

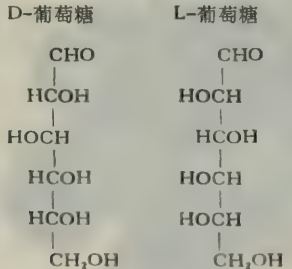


图 10-5 D-和 L-葡萄糖

### 变旋现象和 D-葡萄糖的异头形态

在水溶液中,许多单糖的行为好像它们比图 10-2 和 10-3 那些已知的开链结构式还多一个不对称的中心一样,如 D-葡萄糖就存在两种同分异构型,其旋光率不同,  $\alpha$ -D-葡萄糖为  $[\alpha]_D^{20} = +11.2.2^\circ$ ,而  $\beta$ -D-葡萄糖的  $[\alpha]_D^{20} = +18.7^\circ$ 。两者都已分离出纯品,

虽然在元素组成上它们并无区别,但其物理化学性质则有区别(见表 10-1)。当 D-葡萄糖

表 10-1  $\alpha$ -和  $\beta$ -D-葡萄糖的性质

性 质	$\alpha$ -D-葡萄糖	$\beta$ -D-葡萄糖
旋光率 $[\alpha]_D^{20}$	+112.2°	+18.7°
熔点℃	146	150
水中溶解度,克/100 毫升	82.5	178
用葡萄糖氧化酶氧化的相对比率	100	< 1.0

的  $\alpha$ -和  $\beta$ -同分异构物溶解于水中时,每种糖的旋光度都随时间而逐渐改变,最终趋向一平衡值  $[\alpha]_D^{20} = +52.7^\circ$ 。这种变化称为变旋现象,是由于在 20℃ 时约三分之一的  $\alpha$ -D-葡萄糖和三分之二的  $\beta$ -D-葡萄糖组成了一个平衡的混合物所致。 根据各种化学上的理由而推论出, D-葡萄糖的  $\alpha$ -和  $\beta$ -异构物并不是如图 10-2 所示那样的开链结构,而是由第五碳原子的醇羟基与第一碳原子的醛基起反应形成的六员环结构(图 10-6)。这种六员环型的糖称为吡喃糖,因为它们是杂环化合物吡喃的衍生物。按系统命名,环形的  $\alpha$ -D-葡萄糖应称为  $\alpha$ -D-吡喃葡萄糖。

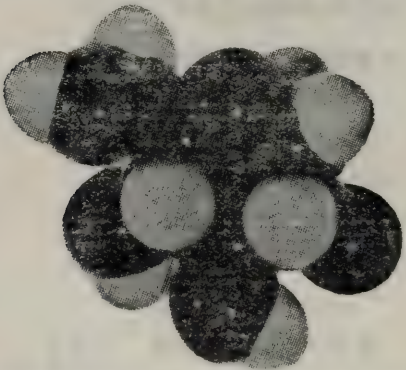
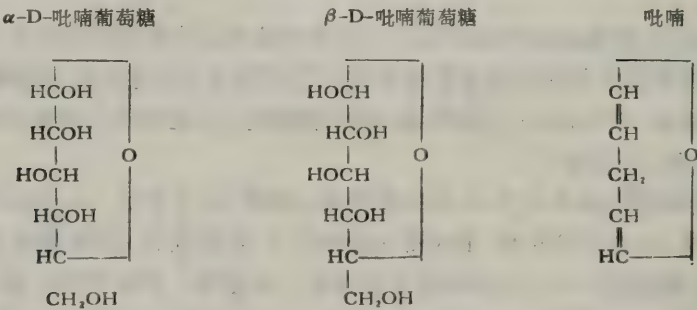


图 10-6  $\alpha$ -和  $\beta$ -型 D-吡喃葡萄糖。并且列出吡喃便于比较其结构。下部是  $\alpha$ -D-吡喃葡萄糖的实体模型。注意在投影结构式上的 D-吡喃葡萄糖的  $\alpha$ -型有向右的异头羟基,它与第五碳原子的羟基在同一侧,这表明此糖是 D-系糖;在  $\beta$ -型的异头羟基是在左边。也应注意异头碳原子与其它碳的区别在于它与两个氧原子连接。

吡喃糖的形成是醛醇之间缩合生成半缩醛这个普通反应的一种特殊情况(图 10-7),因为此半缩醛有一个不对称碳原子,故有两种立体异构形式。酮与醇反应则可形成类似的产物半缩酮。 D-吡喃葡萄糖是由第五碳原子上的羟基与第一碳原子的醛基反应而成



分子内半缩醛,致使第一碳原子不对称,因此 D-吡喃葡萄糖可能存在两种立体异构,称为  $\alpha$ -和  $\beta$ -型(图 10-6)。只是在羰基碳原子上的构型彼此不同的单糖同分异构形式称为异头物(anomers),而此羰基碳原子则称为异头的碳原子。凡具有五个或更多碳原子的单糖均形成稳定的吡喃环并出现异头形态。

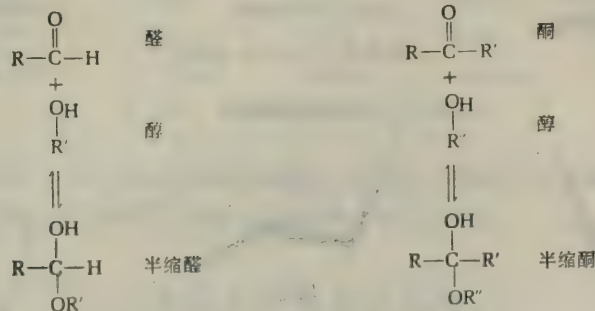


图 10-7 半缩醛和半缩酮。注意其不对称碳原子。

有五个碳原子以上的己酮糖也呈现  $\alpha$ -和  $\beta$ -异头形态。在这些化合物中,第五碳原子上的醇羟基和第二碳原子上的羰基相连接而形成一五员呋喃糖环型的半缩酮,这是一种呋喃的衍生物(图 10-8),普通环型的 D-果糖是  $\beta$ -D-呋喃果糖。己醛糖也可能以呋喃糖的型式存在,但由于六员的吡喃醛糖环要比呋喃糖环稳定得多,故在己醛糖溶液中是以吡喃环为主,开链型的己糖仅有微量出现在溶液中,但它是在变旋光作用时  $\alpha$ -型和  $\beta$ -型互变的中间产物。

虽然我们早些时对糖定义为多羟醛或酮,但大多数天然存在的单糖并没有游离羰基,更恰当的定义应当是多羟缩醛或缩酮。

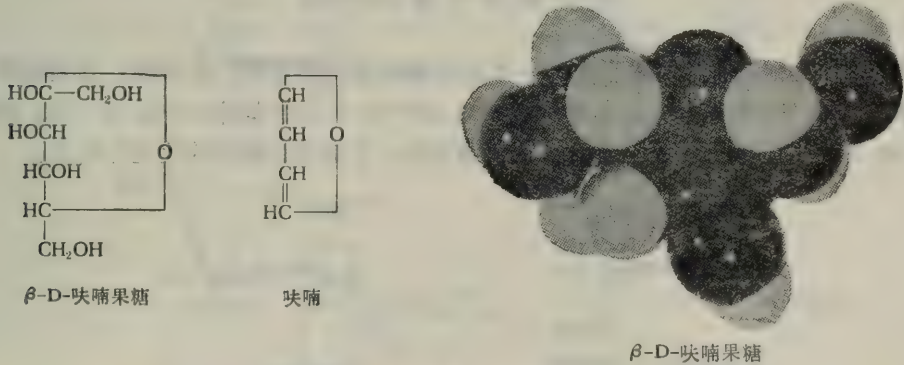


图 10-8 呋喃环

Haworth 氏设计的投影结构式可用来表示单糖类的环状构型,即用粗线来代表靠近读者的一边的环(图 10-9),这种 Haworth 氏投影式是有些错误的,因为他们将五员和六员的呋喃糖或吡喃糖环设想成是平面的,但实际上并不是这样。吡喃环存在两种构型,即椅型和船型(回顾这种构型表示分子内原子的空间排列,这种排列可以通过单键的旋转来实现),吡喃糖环的椅型结构比较坚强,比船型稳定得多,故在溶液中己糖以椅型占优势。椅型结构中的取代基团在几何学上和化学上并不都是同等的;可将它们分为轴向的和赤道的二类(图 10-10)。吡喃糖的赤道羟基要比轴向羟基更容易酯化些。

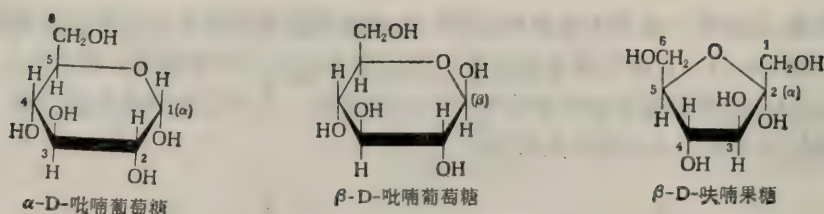


图 10-9 Haworth 投影式

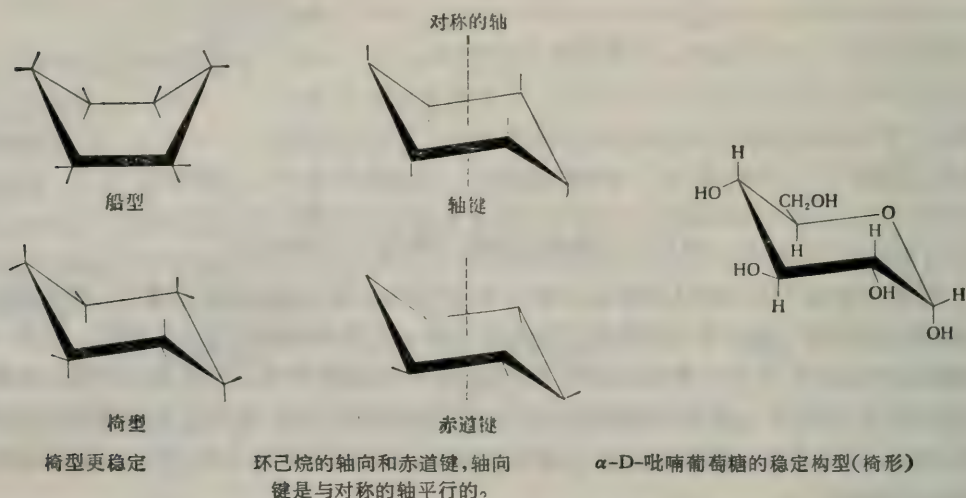


图 10-10 六员环的船形和椅形结构

## 酸和碱对单糖的作用

单糖在热的稀无机酸中是稳定的。然而浓酸则使糖脱水而产生糠醛，它是呋喃的醛衍生物。例如：D-葡萄糖和浓盐酸一起加热，即产生 5-羟甲基糠醛（图 10-11）。糠醛类与酚类如 5-甲基间苯二酚缩合而得到特殊有色物，常常用在糖类的比色分析上。

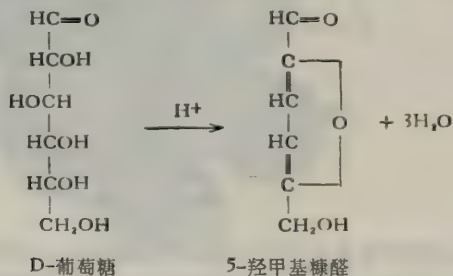


图 10-11 糠醛的形成

在室温下稀碱溶液能使单糖的异头碳原子和其邻近的碳原子重新排列，而不影响到其他碳原子上的取代物。例如以稀碱处理 D-葡萄糖，即产生 D-葡萄糖、D-果糖和 D-甘露糖的平衡混合物（图 10-12），这些反应还涉及第一和第二碳原子上的羟基醛和羟基酮的称为烯二醇的中间烯醇式结构。（图 10-12）



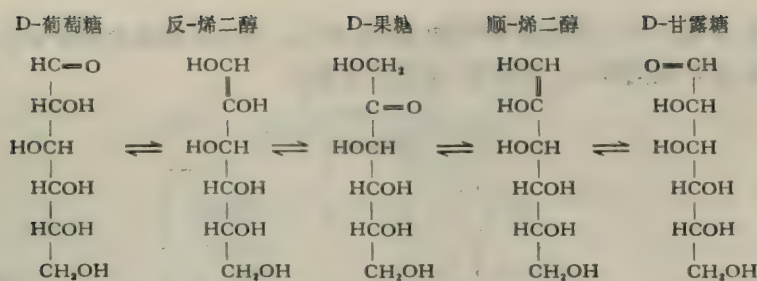


图 10-12 稀硷对 D-葡萄糖的异构化作用

在高温或高浓度下,碱可以使游离单糖进一步发生重新排列、裂解或聚合作用,但正像我们在后面将要知道的,糖苷和某些多糖对碱则是稳定的。

## 单糖类的重要衍生物

### 糖苷类

在无机酸存在下,吡喃醛糖很容易和醇起反应而形成异头的  $\alpha$ -和  $\beta$ -糖苷。这些糖苷是不对称的混合缩醛,它们是由分子内半缩醛的异头碳原子或己醛糖的吡喃型与醇提供的羟基起反应而成的,这就是所谓糖苷键,在这种糖苷中的异头碳是不对称的,D-葡萄糖与甲醇反应可产生甲基  $\alpha$ -D-吡喃葡萄糖苷 ( $[\alpha]_D^{20} = +158.9^\circ$ ) 和甲基  $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷 ( $[\alpha]_D^{20} = -34.2^\circ$ ) 如图 10-13。

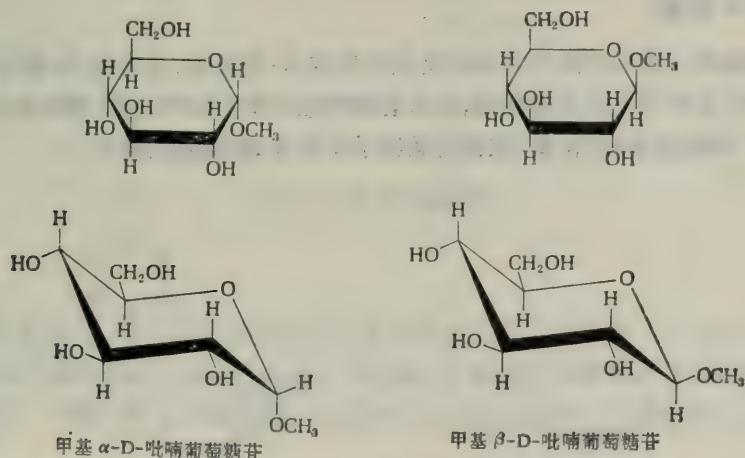


图 10-13 异头的甲基 D-葡萄糖苷的 Haworth 投影式(上)和构型式(下)

一个单糖的异头碳与其他单糖的羟基反应,也形成糖苷键而产生一种双糖。单糖通过糖苷键连接而成的链就是低聚糖和多糖。糖苷键对碱稳定,但是如与酸共煮沸则被水解而产生游离单糖和游离醇,糖苷也能被所谓糖苷酶水解,这类酶对于糖苷键的类型( $\alpha$ -或 $\beta$ -)、单糖单位(单个或多个)的结构和醇的结构有不同的特异性。

一个已知糖苷究竟是以呋喃型还是以吡喃型存在,可以用过碘酸使其氧化降解来确定。过碘酸可以裂解 1,2-二羟化合物,如用过碘酸盐处理甲基  $\alpha$ -D-吡喃葡萄糖苷,使其

吡喃环裂开,产生一个二醛化物和甲酸(图 10-14)。而以过碘酸盐裂解甲基  $\alpha$ -D-呋喃阿拉伯糖苷时,虽产生同样的二醛化物,但没有甲酸。

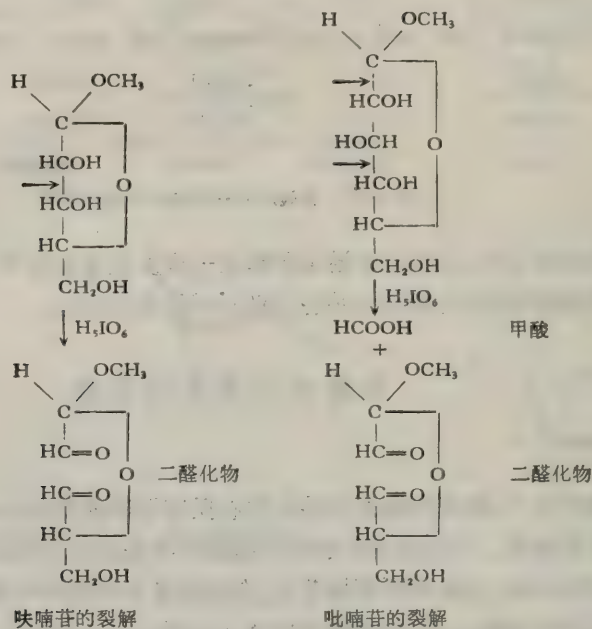


图 10-14 过碘酸盐的作用,能区别呋喃糖苷和吡喃糖苷,因后者产生甲酸。

### N-糖基胺 (N-糖苷)

醛糖和酮糖在适当的溶剂中与胺反应则生成 N-糖基胺,也叫做 N-糖苷(图 10-15),这种化合物在生物学上是很重要的,在核苷酸和核酸里(第十二章)嘌呤或嘧啶碱的环上氮原子与 D-核糖或 2-脱氧-D-核糖的碳原子 1 形成 N-糖基胺键。

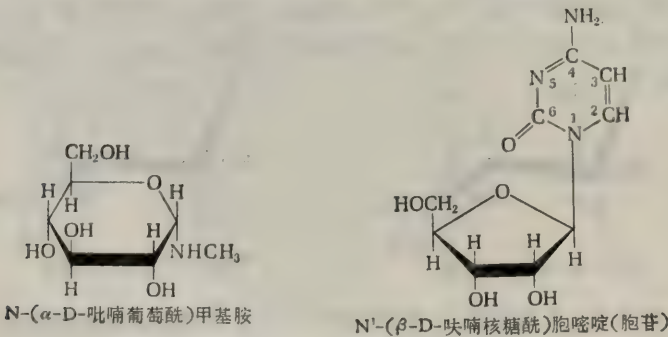


图 10-15 二种 N-糖基胺

### O-酰基衍生物

单糖和多糖的游离羟基可经酰化作用产生 O-酰基衍生物,这在结构测定上颇有用。如以过量的乙酸酐处理  $\alpha$ -D-葡萄糖,则产生五-O-乙酰- $\alpha$ -D-葡萄糖(图 10-16),单糖的全部羟基都能被酰化,即使在反应性上稍有差别。其所产生的酯均可再水解。



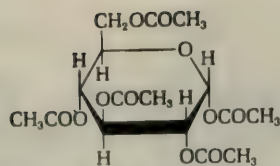


图 10-16 五-O-乙酰- $\alpha$ -D-葡萄糖

## O-甲基衍生物

单糖的羟基也可以甲基化,在有酸存在时,异头碳原子上的羟基容易与甲醇反应而产生甲基糖苷的缩醛,单糖其他羟基的甲基化则需要剧烈得多的条件,例如用硫酸二甲酯或碘甲烷加氧化银处理,在这种情况下,生成的是甲醚而不是甲基缩醛,甲基缩醛在加酸煮沸时容易水解,而甲醚则否。糖的全部游离羟基的甲基化作用称为彻底甲基化作用。彻底甲基化作用常用来确定诸如氨基、磷酸根或糖苷键等(见后)取代基的位置,在这些位置上的羟基已不再是游离的,因而不能形成醚,此反应也常用于测定某一单糖究竟是呋喃糖还是吡喃糖,例如甲基  $\alpha$ -D-吡喃葡萄糖苷经甲基化作用后,产生甲基-2,3,4,6-四-O-甲基-D-吡喃葡萄糖苷。(图 10-17)

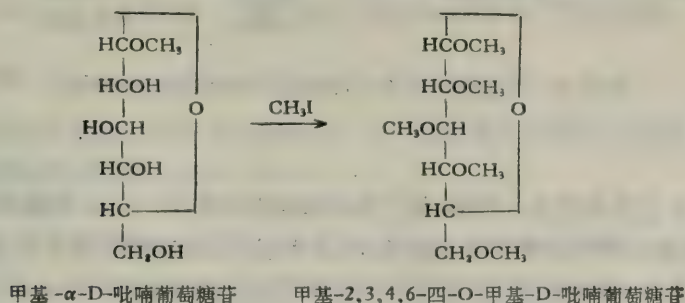


图 10-17 彻底甲基化作用

## 脎

在弱酸性溶液中,  $100^{\circ}\text{C}$  下单糖类与过量的苯肼反应形成苯脎,它不溶于水,且易结晶。D-葡萄糖苯脎的结构式见图 10-18。葡萄糖、果糖和甘露糖都生成同样的苯脎,因为它们结构上第一和第二碳原子在构型上的差别已在成脎时消失了。脎可用以鉴定糖类。

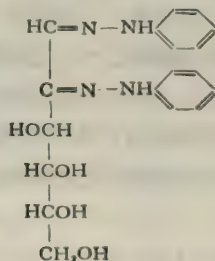


图 10-18 D-葡萄糖苯脎

## 糖醇

单糖的羰基在有金属催化剂存在时,可被气体  $H_2$ , 或在水中被钠汞齐还原,形成相应的糖醇,如 D-蔷薇醇。但 L-山梨糖还原也可以得到同样的产物而常常称为 L-山梨醇。D-甘露糖则产生 D-甘露醇。这些还原作用也可以用酶来实现。

两种其他糖醇在自然界比较多见,一种是甘油,是某些脂类的重要成分;另一种则是完全羟基化了的环己烷衍生物肌醇,它有几种立体异构型,肌醇的立体异构物之一,肌-环己六醇,不仅见之于脂类,如磷脂酰肌醇,也见之于植酸,即肌醇的六磷酸酯,植酸的钙-镁盐称为非丁(肌醇六磷酸钙镁),广泛存在于高等植物组织的细胞外支架物质中。某些糖醇的结构见图 10-19。

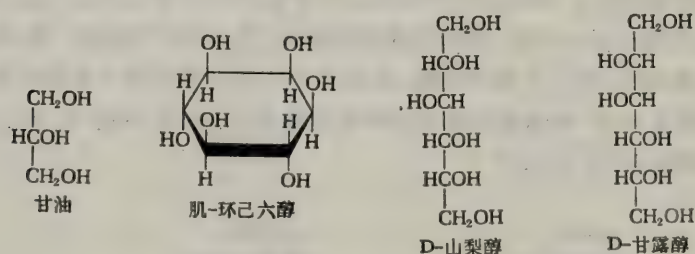


图 10-19 某些糖醇。肌-环己六醇是最丰富的肌醇立体异构物。

## 糖酸

糖酸的三个主要类型是:糖酸、糖二酸和糖醛酸(图 10-20)。用弱氧化剂(如次亚碘酸钠)或特异的酶来氧化醛糖的醛基碳原子,使形成相应的羧酸,通常称为糖酸,例如 D-葡萄糖氧化产生 D-葡萄糖酸,其磷酸化物是糖代谢的重要中间产物。

若用一种强氧化剂如硝酸,则醛基碳原子和带伯醇羟基的碳原子都被氧化成羧基,产生糖二酸(也称糖质酸),D-葡萄糖的产品就称 D-葡萄糖二酸,糖二酸有时用于鉴别糖类,但没有重要的生物学意义。

然而第三类糖酸,即糖醛酸,在生物学上非常重要。在糖醛酸上仅仅带伯醇羟基的碳原子被氧化成为羧基。从 D-葡萄糖衍生的糖醛酸即 D-葡萄糖醛酸。其他重要的糖醛酸有 D-半乳糖醛酸和 D-甘露糖醛酸,糖醛酸也是许多多糖的成分,糖酸和糖醛酸如能形成五员或六员环,则常常以内酯的形式存在,例如 D- $\delta$ -葡萄糖酸内酯和 D- $\delta$ -葡萄糖醛酸内酯。

抗坏血酸或维生素 C 是极重要的糖酸之一,它是在第二和第三碳原子上有烯二醇结构的己糖酸的  $\gamma$ -内酯(图 10-20),是一个极不稳定的化合物,容易氧化成脱氢抗坏血酸。人类食物中若长期缺乏抗坏血酸,结果就将产生坏血病,缺乏得不太严重也会导致结缔组织结构上的变化,还会使对某些传染病的抵抗力降低。抗坏血酸大量存在于柑橘类水果和番茄中。

单糖可以利用它们在碱性溶液中易被  $Cu^{2+}$ 、 $Ag^+$  或铁氰化物所氧化,结果产生糖酸混合物的反应作为检查或定量测定的基础,能还原这种氧化剂的糖称为还原糖。





图 10-20 糖酸和内酯, 在内酯上碳原子从邻近羧基起以希腊字母标明位置。

## 糖的磷酸化合物

单糖的磷酸衍生物见之于所有活细胞中, 它们在那里充当糖代谢的重要中间产物, 有代表性的糖的磷酸化合物列出如图 10-21。

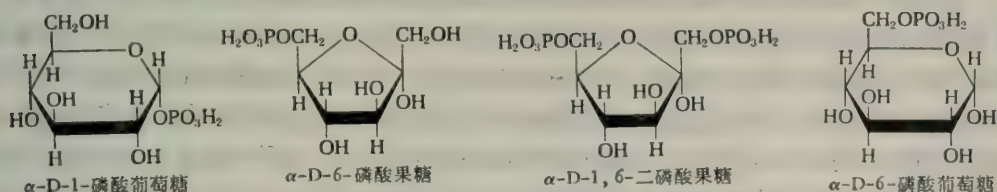


图 10-21 某些磷酸己糖

## 脱氧糖

在自然界存在有几种脱氧糖(图 10-22), 最丰富的是 2-脱氧-D-核糖, 它是脱氧核糖

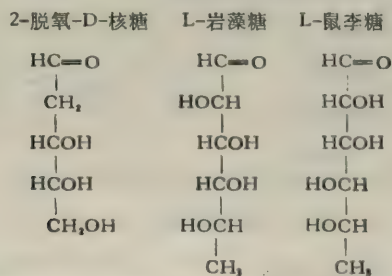


图 10-22 某些脱氧糖。(开链形)

核酸的成分，L-鼠李糖（6-脱氧-L-甘露糖）和 L-岩藻糖（6-脱氧-L-半乳糖）是某些细菌细胞壁的重要成分。

### 氨基糖

广泛分布的两种氨基糖为 D-氨基葡萄糖（2-氨基-2-脱氧-D-葡萄糖）和 D-氨基半乳糖（2-氨基-2-脱氧-D-半乳糖），它们的第二个碳原子上的羟基被氨基取代（图 10-23），氨基葡萄糖存在于脊椎动物组织的许多多糖中，并且也是甲壳质的主要成分。甲壳质是存在于昆虫和甲壳类外壳中的结构多糖。D-氨基半乳糖是糖脂的成分，也是软骨中重要多糖硫酸软骨素的成分

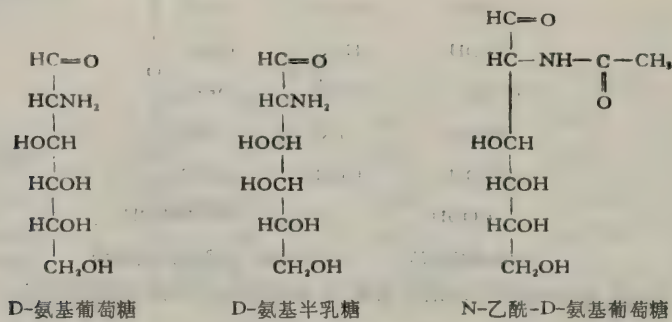


图 10-23 普通氨基糖和氨基糖衍生物

### 胞壁酸和神经氨酸

这些糖的衍生物，分别是细菌的细胞壁和高等动物细胞外膜中存在的结构多糖类的重要组分，两者都是九碳糖衍生物，可以将它们看作是由一个六碳氨基糖连结一个三碳糖酸所构成，氨基通常是乙酰化的，N-乙酰胞壁酸（图 10-24）是细菌细胞壁多糖骨架的重要组成成分，它是由 N-乙酰-D-氨基葡萄糖与三碳 D-乳酸以醚键相连而构成的，N-乙酰神经氨酸则是由 N-乙酰-D-氨基甘露糖和丙酮酸衍生的，它是动物组织细胞外膜和细胞膜的糖蛋白和糖脂中低聚糖链的重要基本单位。神经氨酸的 N-酰基衍生物，即通常所谓的涎酸，见于人类组织中，含有 N-乙酰基；在某些其他种涎酸中还含有 N-羟乙烯基。

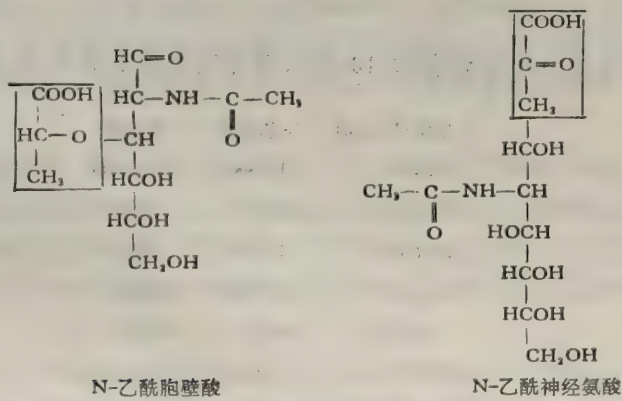


图 10-24 N-乙酰胞壁酸和 N-乙酰神经氨酸。方框部分是从三碳酸衍生来的。



## 双 糖 类

双糖是由两个单糖通过糖苷键连接而成,最普通的双糖是麦芽糖、乳糖和蔗糖(图 10-25)。麦芽糖是淀粉酶作用于淀粉的中间产物,其结构中含有两个葡萄糖残基。它是 D-葡萄糖第一个异头碳原子的混合缩醛;一个羟基是由分子内第五碳原子提供的,另一个则是由第二个 D-葡萄糖分子的第四碳原子提供的。麦芽糖中的两个葡萄糖都是吡喃糖型,并且其异头碳原子上糖苷键的构型是  $\alpha$  型,所以麦芽糖又叫作 O- $\alpha$ -D-吡喃葡萄糖基-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷。麦芽糖的第二个葡萄糖残基有一个游离的异头碳原子,能以  $\alpha$  和  $\beta$  两型存在,在自然界是以  $\beta$  型占优势。第一个残基不能氧化,而第二个则能,故称为还原末端,在二个葡萄糖残基之间的糖苷键以符号  $\alpha(1 \rightarrow 4)$  表示,彻底甲基化作用使全部游离羟基甲基化,然后再水解其糖苷键,可以证明在麦芽糖中此键涉及第一个残基的碳原子 1 和第二个葡萄糖单位的碳原子 4。形成的两个甲基化了的碎片是 2, 3, 4, 6-四-O-甲基-D-葡萄糖和 2, 3, 6-三-O-甲基-D-葡萄糖。

另外两种含两个 D-葡萄糖单位的普通双糖是纤维二糖和龙胆二糖,纤维二糖是纤维素的重复双糖单位,具有  $\beta(1 \rightarrow 4)$  糖苷键,因此它的全名是 O- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖基-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷。在龙胆二糖里则是  $\beta(1 \rightarrow 6)$  键。由于这两个双糖里都有一个游离的异头碳原子,所以它们是还原糖。

乳糖 [O- $\beta$ -D-吡喃半乳糖基-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷] 是乳汁中存在的双糖,此外,自然界并无其他场合存在有乳糖。乳糖水解时生成 D-半乳糖和 D-葡萄糖,由于其葡萄糖残基上有一个游离的异头碳原子,故乳糖是一种有还原性的双糖。(图 10-25)。

蔗糖(甘蔗糖)是由葡萄糖和果糖构成的双糖 [O- $\beta$ -D-呋喃果糖基-(2 $\rightarrow$ 1)- $\alpha$ -D-吡喃葡萄糖苷] (图 10-25),它在植物界非常丰富,是大家熟知的食糖。与大多数双糖和低聚糖不同,蔗糖不含游离的异头碳原子,它的二个己糖的异头碳原子彼此连接,因此蔗糖没有变旋光作用,也不与苯肼起反应生成脎,并且也没有还原糖的作用,它比其他双糖要更容易水解得多。蔗糖 ( $[\alpha]_D^{20} = +66.5^\circ$ ) 水解成 D-葡萄糖 ( $[\alpha]_D^{20} = +52.5^\circ$ ) 和 D-果糖 ( $[\alpha]_D^{20} = -92^\circ$ ), 常常称为转化作用,因为当葡萄糖和果糖形成等克分子混合物时,伴有旋光性从右旋变为左旋的净转变,这种混合物常称为转化糖,蔗糖的水解也可经由转化酶催化,故可用一旋光计来跟踪它。

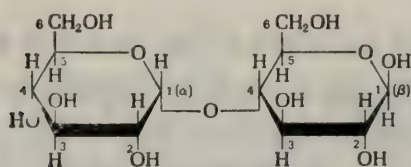
海藻糖 [O- $\alpha$ -D-吡喃葡萄糖基-(1 $\rightarrow$ 1)- $\alpha$ -D-吡喃葡萄糖苷] 亦含有两个葡萄糖残基,是非还原性双糖的又一例,它的两个异头碳原子互相连接。这是在许多昆虫血淋巴中发现的一种主要的糖。

## 三 糖 类

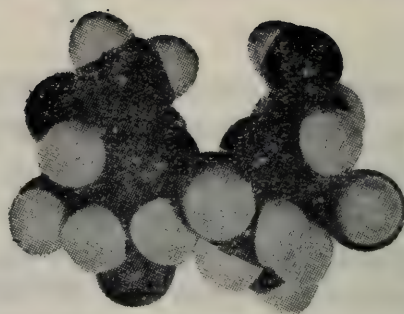
有许多三糖以游离的形式存在于自然界,棉子糖 [O- $\alpha$ -D-吡喃半乳糖基-(1 $\rightarrow$ 6)-O- $\alpha$ -D-吡喃葡萄糖基-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-呋喃果糖苷] 就大量存在于糖甜菜和许多其他高等植物中。松三糖 [O- $\alpha$ -D-吡喃葡萄糖基-(1 $\rightarrow$ 3)-O- $\beta$ -D-呋喃果糖基-(2 $\rightarrow$ 1)- $\alpha$ -D-吡喃葡萄糖苷] 则存在于某些松柏科的树液中。

### 麦芽糖( $\beta$ 型)

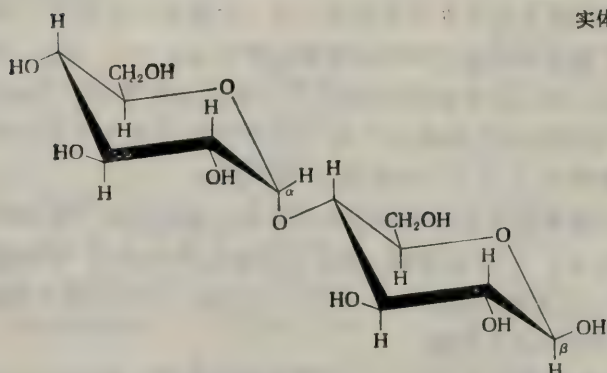
[O- $\alpha$ -D-吡喃葡萄糖酰-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷]



Haworth 投影



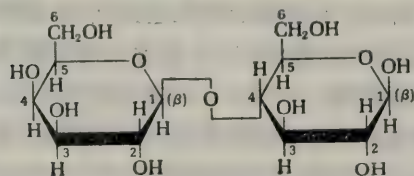
实体模型



构型

### 乳糖( $\beta$ 型)

[O- $\beta$ -D-吡喃半乳糖酰-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷]



### 蔗糖

[O- $\beta$ -D-呋喃果糖酰-(2 $\rightarrow$ 1)- $\alpha$ -D-吡喃葡萄糖苷]

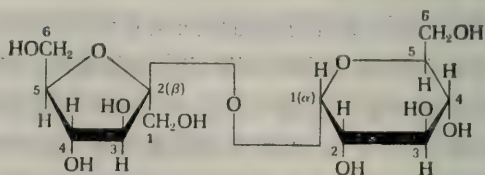


图 10-25 重要的双糖

## 单糖类和低聚糖类的鉴定和分析

层析技术革新了糖类及其衍生物的提取、分离和鉴定的工艺。纸层析法与薄层层析法已广泛应用。为了最有效的分离和分析,可将糖的混合物在有过量硼酸存在的离子交换柱上进行层析,硼酸可使中性的糖变成弱酸性的硼酸络合物,因而基于它们酸碱性质上的差别,得以更有效的分开。这种硼酸络合物的结构并不确切了解,但它们易分解为游离的糖和硼酸。现已设计出类似氨基酸分析仪那样的自动系统,用来分析从水解低聚糖和多糖得到的糖混合物。



## 多糖(聚糖)

在自然界发现的糖类,绝大多数是以高分子量的多糖出现。用酸或特异性的酶完全水解这些多糖后,产生单糖和(或)简单的单糖衍生物。D-葡萄糖是多糖中最普遍的单糖单位,但由D-甘露糖、D-果糖、D-和L-半乳糖、D-木糖和D-阿拉伯糖等组成的多糖也常见。天然多糖水解物中很常见的单糖衍生物则有: D-氨基葡萄糖、D-氨基半乳糖、D-葡萄糖醛酸、N-乙酰胞壁酸和N-乙酰神经氨酸等等。

多糖类也称为聚糖类,它们不同之处在于重复出现的单糖单位的性质、链的长度和分支程度。它们可以分为同多糖和杂多糖。同多糖是仅由同一类型的单糖单位组成,杂多糖则含有二种或更多不同的单糖单位。如淀粉,仅含有D-葡萄糖单位,是一种同多糖;透明质酸是由葡萄糖醛酸残基和N-乙酰-D-氨基葡萄糖残基交替组成,因而是一种杂多糖。同多糖总是以能够表示其结构单位性质的类别名来命名的。例如像淀粉和糖原那样只含D-葡萄糖单位的,称为葡聚糖,而那些含甘露糖单位的就称为甘露聚糖。重要的多糖最好按它们的生物学功能来说明。

## 储存多糖

这些多糖中,淀粉是植物中最丰富的,糖原则是动物中最丰富的。它们通常总是以大颗粒状蕴藏于细胞的胞质中。糖原或淀粉颗粒可用示差离心法从细胞提取物中分离出来,在葡萄糖过剩时,单个的葡萄糖就通过酶促作用联结到淀粉或糖原链的末端,而在代谢需要时,它们又通过酶促作用释放出来作燃料用。

### 淀粉

淀粉以两种形式存在,即 $\alpha$ -直链淀粉和支链淀粉。 $\alpha$ -直链淀粉是由其所组成的全部葡萄糖单位通过 $\alpha(1 \rightarrow 4)$ 连接而成的无分支的长链,链系多分散(polydisperse),其分子量可以从数千至500,000。直链淀粉并不真正溶解于水,但可以形成水化胶粒,它与碘呈蓝色反应,在这种胶粒中,多糖链盘绕成螺旋状(图10-26),支链淀粉是高度分支的,其分支的长度随不同种类从24—30个葡萄糖残基不等,其主链上的糖苷键是 $\alpha(1 \rightarrow 4)$ ,但在分支点上则为 $\alpha(1 \rightarrow 6)$ 键(图10-27),支链淀粉也产生胶态或胶粒溶液,与碘呈紫红色反应,其分子量可以高到一亿。

淀粉的重要成分可以通过两种不同途径进行酶促水解。直链淀粉可用 $\alpha$ -淀粉酶来水解[ $\alpha(1 \rightarrow 4)$ -葡聚糖 4-葡聚糖水解酶],此酶存在于唾液和胰液并在胃肠道参与淀粉的消化。它随机水解 $\alpha(1 \rightarrow 4)$ 键,产生葡萄糖和游离麦芽糖的混合物,此游离麦芽糖是不再受淀粉酶作用的。也可以用 $\beta$ -淀粉酶[ $\alpha(1 \rightarrow 4)$ 葡聚糖麦芽糖水解酶]来水解淀粉,此酶存在于麦芽中,能从非还原末端开始,连续地水解下麦芽糖单位而得到全部的麦芽糖。 $\alpha$ -和 $\beta$ -淀粉酶也能作用于支链淀粉(图10-28)。在淀粉酶作用下产生的中等链长的多糖称为糊精。由于 $\alpha$ -和 $\beta$ -淀粉酶都不能水解支链淀粉分支点上的 $\alpha(1 \rightarrow 6)$ 键,所以支链淀粉虽经淀粉酶的彻底作用,其终产物仍是一个大的、高度分支的“核心”,称为极限

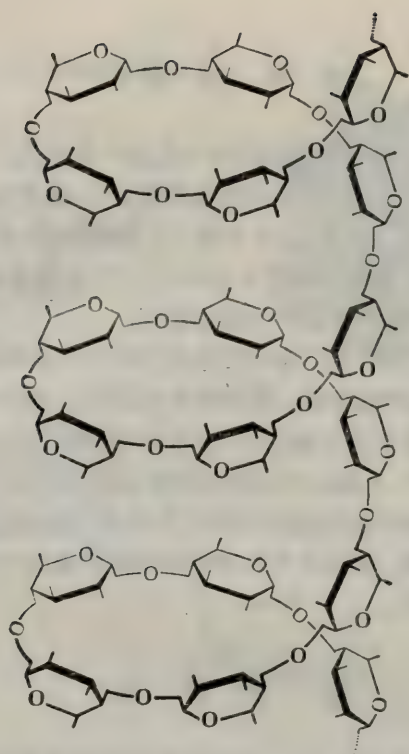


图 10-26 直链淀粉的螺旋圈

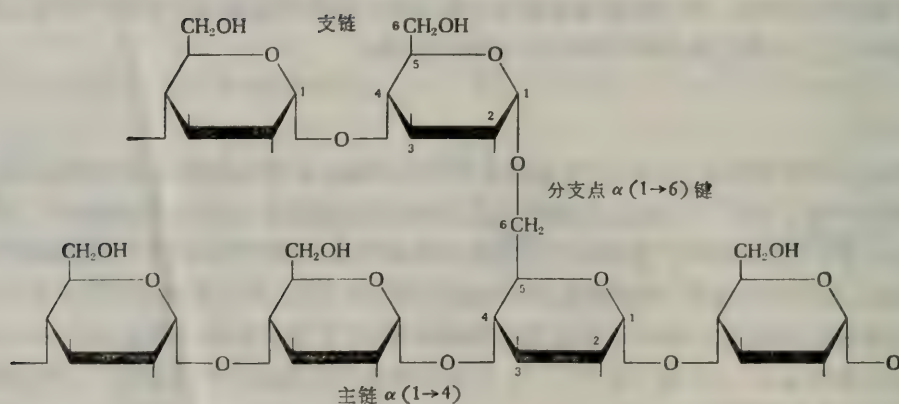


图 10-27 支链淀粉的  $\alpha(1 \rightarrow 6)$  分支点

糊精,所以这么称呼是因为它代表了淀粉酶作用的极限(图 10-28)。脱支酶 [ $\alpha(1 \rightarrow 6)$ -葡聚糖6-葡聚糖水解酶,又称为  $\alpha(1 \rightarrow 6)$ -葡萄糖苷酶]能在分支点水解  $\alpha(1 \rightarrow 6)$  键。故  $\alpha$ -淀粉酶和  $\alpha(1 \rightarrow 6)$  糖苷酶联合作用,可以完全降解支链淀粉成为葡萄糖和麦芽糖。

## 糖原

像淀粉在植物细胞中一样,糖原是动物细胞的主要储存多糖。糖原在肝脏中特别丰富,可达到湿重的 10%,在骨骼肌中也有约 1—2%。在肝细胞中,糖原是以大颗粒存在,



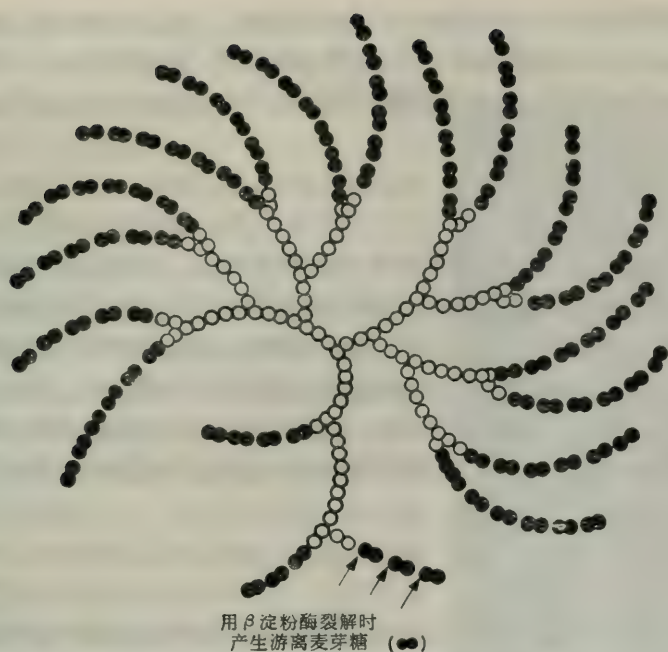


图 10-28  $\beta$ -淀粉酶对支链淀粉的作用,连续的麦芽糖残基被水解脱下直到  $\alpha(1 \rightarrow 6)$  分支点,剩下的核心即极限糊精,它约占整个分子的百分之四十。

由单个高度分支的、分子量为几百万的分子所组成的较小的颗粒集结而成。(图 10-29)

糖原也像支链淀粉一样,是 D-葡萄糖以  $\alpha(1 \rightarrow 4)$  键连接而成的多糖。然而它是分支程度和紧密度比支链淀粉更高的分子,约每 8—12 个葡萄糖残基即出现分支,其分支键



图 10-29 田鼠肝细胞内糖原颗粒的电子显微镜图。它们由许多较小的直径 15—30 毫微米的颗粒团集而成,如图所示,它们通常存在于内质网的光滑表面附近。

是  $\alpha(1 \rightarrow 6)$ 。糖原可以用热 KOH 溶液消化动物组织后, 将其分离出来。在 KOH 溶液中, 其非还原性的  $\alpha(1 \rightarrow 4)$  键和  $\alpha(1 \rightarrow 6)$  键都是稳定的。糖原容易被  $\alpha$ -和  $\beta$ -淀粉酶水解, 分别形成葡萄糖和麦芽糖, 在  $\beta$ -淀粉酶作用下也产生极限糊精, 糖原与碘产生红紫色反应。

### 其它储存多糖

葡聚糖 (Dextrans) 也是由 D-葡萄糖构成的分支多糖, 但它们与糖原和淀粉不同之处是具有  $\alpha(1 \rightarrow 4)$  以外的骨架键, 它们是酵母和细菌的储存多糖, 在不同种属中, 其分支点也很不同, 可以是  $1 \rightarrow 2$ ,  $1 \rightarrow 3$ ,  $1 \rightarrow 4$  或  $1 \rightarrow 6$ 。葡聚糖形成高度粘稠的糊状溶液。果聚糖 (也称左聚糖) 是由 D-果糖单位组成的同多糖, 存在于许多植物中。菊粉存在于菊芋, 是由 D-果糖残基以  $\beta(2 \rightarrow 1)$  糖苷键构成。甘露聚糖是甘露糖组成的同多糖, 存在于细菌、酵母、霉菌和高等植物中。同样, 木聚糖和阿聚糖是见之于植物组织的同多糖。

## 结 构 多 糖

许多多糖在细胞壁和外膜、细胞间隙和结缔组织的首要作用是作为结构成分, 它赋予植物或动物组织以形态、弹性或刚性, 以及赋予单细胞生物以保护和支撑。还发现多糖是许多无脊椎动物外骨骼的重要有机成分。例如壳多糖就是 N-乙酰-D-氨基葡萄糖以  $\beta(1 \rightarrow 4)$  键连接而成的同多糖, 是昆虫和甲壳类外骨骼的重要有机成分。

细胞壁和外膜不仅在维持组织结构上重要, 而且还含有细胞-细胞的识别位点, 在组织和器官的发生上也是重要的, 它们还含有其他保护性成分, 如脊椎动物组织的细胞表面的抗体。因此, 我们应该检查结构多糖在细胞壁和外膜的分子排列上的前后关系。

### 植物细胞壁

由于植物细胞要能经得住细胞内外液之间的巨大渗透压差, 它们必须有硬的细胞壁以保持不致膨胀。在较大的植物和树, 其细胞壁不仅要有助于茎干、叶子和根组织的物理强度或硬度, 而且也必须能支持巨大的重量。

在植物界, 最丰富的结构上的和细胞壁的多糖是纤维素, 它是由 D-葡萄糖以  $\beta(1 \rightarrow 4)$  键连接的线性聚合物。纤维素是木材并且也是纸的主要成分, 棉花几乎是纯粹的纤维素。纤维素也存在于某些低等无脊椎动物, 几乎完全在细胞外结构中存在。

用强酸完全水解纤维素, 仅仅产生 D-葡萄糖, 但部分水解时则产生还原性的二糖——纤维二糖, 它的 D-葡萄糖单位之间的糖苷键是  $\beta(1 \rightarrow 4)$  键。如果将纤维素先彻底甲基化然后再水解, 其产物只有 2,3,6-三-O-甲基葡萄糖, 这不仅说明它所有的都是  $\beta(1 \rightarrow 4)$  糖苷键, 并且也说明它没有分支点。淀粉和纤维素都是由 D-葡萄糖组成的同多糖, 它们之间化学上唯一的区别在于: 淀粉是以  $\alpha(1 \rightarrow 4)$  键连接, 而纤维素则是以  $\beta(1 \rightarrow 4)$  键连接的。纤维素不受  $\alpha$ -和  $\beta$ -淀粉酶的作用, 事实上大多数哺乳动物的消化道并不分泌能水解纤维素的  $\beta(1 \rightarrow 4)$  糖苷键的酶。因此, 他们不能用纤维素作为食物。然而像牛一类反刍动物是例外, 因为在其第一胃中存在的细菌能产生纤维素酶, 水解纤维素成 D-葡萄糖, 故能利用纤维素作为食物。



从不同品种来源的纤维素测得的最小分子量波动于 50,000—2,500,000 之间,相当于 300 至 15,000 个葡萄糖残基。X 光衍射分析表明,纤维素分子是组织成一束束的平行链或形成原纤维(图 10-30)。虽然纤维素对水有高度亲合力,但完全不溶于水。

在植物的细胞壁里,紧密包扎的纤维素原纤维成有规律的平行排列围绕着细胞,常常成十字形的交叉层叠(图 10-30)。这些原纤维由三种其他聚合物即半纤维素、果胶和伸展素(extensin)所组成的基质粘着在一起。半纤维素与纤维素并无结构上的关系,而是一种戊糖的聚合物,特别是 D-木糖, D-木糖以  $\beta$ -(1  $\rightarrow$  4) 键连接,并带有阿拉伯糖和其他糖组成的侧链。果胶是甲基 D-半乳糖醛酸的聚合物。伸展素是复杂的糖蛋白,以共价键与纤维素原纤维接在一起。伸展素与它在动物组织中的相对物胶原一样,含有丰富的羟脯氨酸残基;也含有许多带阿拉伯糖和半乳糖残基的侧链,高等植物的细胞壁好比加固的钢筋混凝土的框子,由纤维素构成的原纤维相当于钢筋,基质就像混凝土,这样的壁能承受巨大的重量和物理应力。木材还含有另外一种聚合物木质素,它几乎构成木材干重的 25%。木质素是一种芳香醇的聚合物。

在植物中,其他可以用作细胞壁或结构成分的多糖还包括海藻中的琼脂,它含有 D-和 L-半乳糖残基,其中有些是与硫酸酯化了的,海藻和海藻的藻酸含有 D-甘露糖醛酸单位;阿拉伯树胶是一种植物胶,含有 D-半乳糖和 D-葡萄糖醛酸残基以及阿拉伯糖和鼠李糖。

## 细菌细胞壁

细菌细胞壁是硬的、多孔的、盒子样的结构,它对细胞起物理的保护作用。由于细菌本有高的内部渗透压,而它们又经常暴露于一完全可变的和有时是低渗的外环境中,故它必须有坚硬的细胞壁,以防止细胞膜的膨胀和破裂。因为细菌细胞壁含有特殊抗原,可用于诊断传染病,并且也因为用青霉素和其他医用抗菌素能抑制细菌细胞壁的生物合成,故对它们的结构和生物合成已有深入的研究。

按细菌对革兰氏染料的反应,可以经典地把它分为革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌两大类。革兰氏反应即连续地以染料结晶紫和以碘处理,然后脱色,再以硷性藏红花红(safranin)处理细胞的一种实验操作。革兰氏阳性细胞的壁含有非常少量的脂质,如白色链球菌和支原菌细球菌,而革兰氏阴性细胞的壁是富于脂质的,如大肠杆菌。将革兰氏阴性细菌的浓悬液与极细的玻璃珠一起震摇以破坏其细胞壁,然后将细菌内容物洗出,这



图 10-30 一种硬毛藻 (*Chaetomorpha*) 细胞壁的电子显微镜图,细胞壁是由连续多层平行排列的纤维素纤维构成的。

样就可以分离出革兰氏阴性细菌的细胞壁。细胞壁显得相当薄,但它是高度致密的,它们构成革兰氏阴性菌干重的 20—30%。

革兰氏阳性和革兰氏阴性的细胞壁有一个共同的分子特征,即两者的硬结构骨架都是由平行的多糖链与肽链交叉连接而成的。这种骨架构成细胞壁重量的 50% 或更多。在这个骨架上附着特有的附属成分,就像我们随后会知道的,它们在革兰氏阳性和革兰氏阴性细胞里是不相同的。细胞壁的这种共价连接的骨架实际上可以看成是一个单纯的大囊状分子,称为肽聚糖 (peptidoglycan) 或胞壁质 (murein 是从拉丁文 murus 来的,意为“墙壁”)。肽聚糖的结构和酶促生物合成在 Strominger 及其共同工作者研究青霉素的作用机制时已大部分弄清楚了。在肽聚糖的结构中,其重复出现的基本单位是壁质肽 (muro-peptide)(图 10-31),它是一个由 N-乙酰-D-氨基葡萄糖和 N-乙酰胞壁酸通过  $\beta(1 \rightarrow 4)$

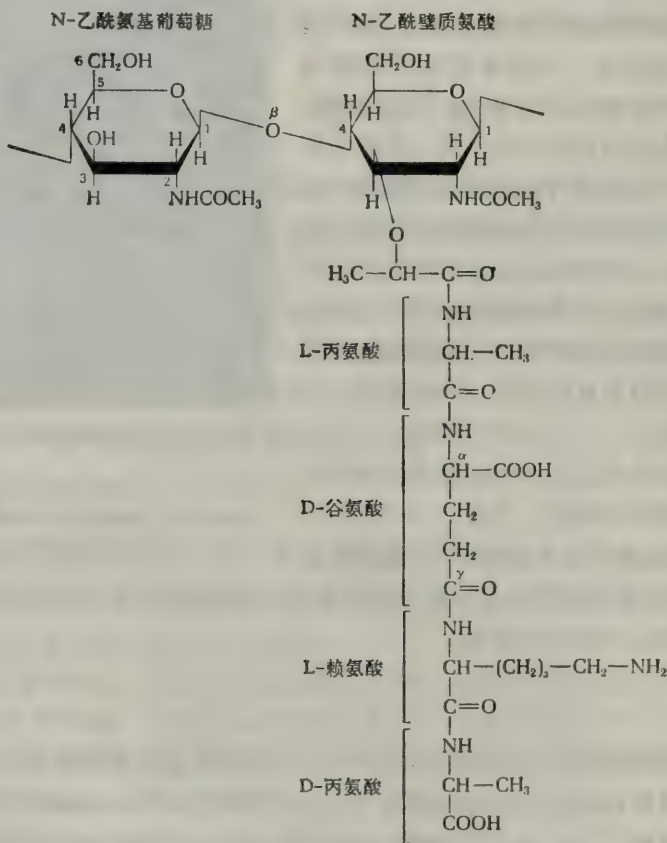


图 10-31 重复出现的细菌细胞壁的壁质肽。它是由一个双糖接上一个四肽旁链组成的。其连续单位之间以  $\beta(1 \rightarrow 4)$  糖苷键连接,其 D-谷氨酸残基是以  $\gamma$ -羧基接到 L-赖氨酸上,故以 D-异谷氨酸表示,在某些种细菌如金色葡萄球菌, D-谷氨酸残基的  $\alpha$ -羧基是被一氨基取代的,后者称为异谷氨酸酰胺。

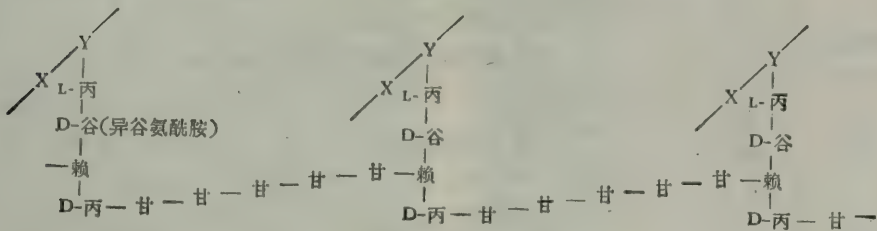
键连接的双糖。其骨架可以看作是一个在交替出现的残基上有乳酸取代的壳多糖。在主链上 N-乙酰胞壁酸残基的羧基上连接一个四肽旁链,每肽含有 L-丙氨酸、D-丙氨酸、D-谷氨酸或 D-谷氨酰胺和(或)内消旋二氨基庚二酸、L-赖氨酸、L-羟赖氨酸或鸟氨酸中的任一个,这决定于细菌的种属。



细胞壁的平行多糖链是通过其肽旁链相互交联着的。一个多糖链上肽旁链的末端 D-丙氨酸残基共价地接到邻近一个多糖链的肽旁链上，这种连接或如在大肠杆菌上是直接的，或如在金黄色葡萄球菌上是通过另一五甘氨酸的短肽来连接的（图 10-32）。此种肽聚糖形成一个完全连续的共价结构包围着细胞；革兰氏阳性菌就是包在多达 20 层的交叉连接着的肽聚糖里面。

细菌细胞壁的这种肽聚糖结构能抵抗肽水解酶的作用，此酶不能作用于含有 D-氨基酸的肽。然而在泪液及蛋清中发现的溶菌酶能使革兰氏阳性菌如支原菌溶解，即是通过水

X—Y 是主链，X 表示 N-乙酰氨基葡萄糖残基，Y 为 N-乙酰胞壁酸残基，每个双糖单位的四肽旁链是通过一个甘氨酸五肽交联到邻近的链上。



几条并列的肽聚糖链排成紧密的交联结构，每个胞壁质链约有 12 个双糖单位长，图上垂直线表示四肽旁链，水平线表示五肽交联键。

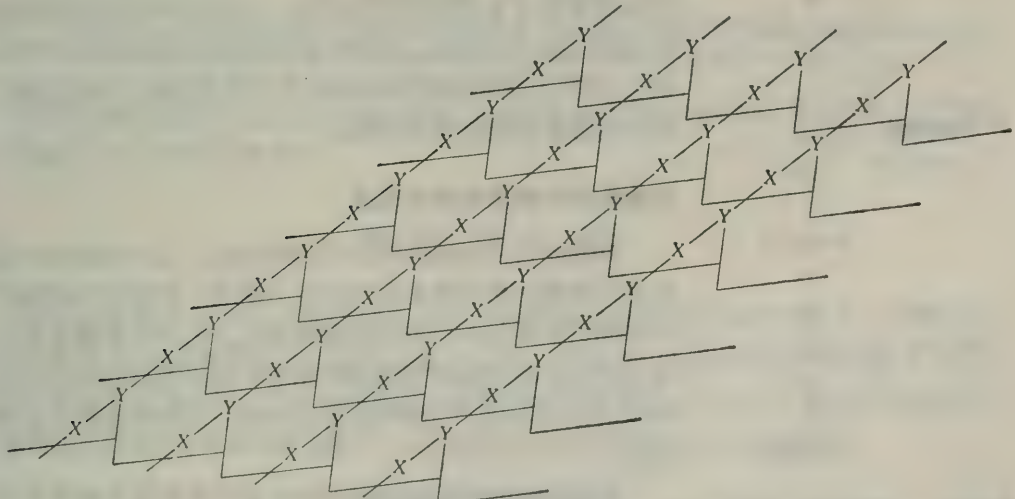


图 10-32 金黄色葡萄球菌细胞壁中肽聚糖链的交叉连接方式

解其肽聚糖的多糖骨架上的  $\beta(1 \rightarrow 4)$  糖苷键 (Lysodeikticus 这一名称是从希腊文 “lysis meter”，意即溶解物一词衍生来的，这种生物常用来检验溶菌酶制剂的生物活性)。溶菌酶作用的产物是 N-乙酰-D-氨基葡萄糖和 N-乙酰胞壁酸组成的双糖；肽旁链仍旧接在 N-乙酰胞壁酸上。骨架一旦被这么断裂，细胞即膨胀，膜即会破裂而使细胞内容物丧失。但是当革兰氏阳性细菌在有高浓度非透性溶质(如蔗糖)存在下 (0.8 M) 以溶菌酶处理时，去掉壁以后的细胞得到保护，不因渗压而胀破。这种仅仅只有膜包着的裸露的细菌细胞称为原生质体。原生质体很易破碎，只当介质是等渗以防止因膨胀而引起的破裂时，才能保持完整。

细菌细胞壁还含有一些附属的聚合物，附属于肽聚糖骨架上，它们往往达到壁重的50%，这些附属成分随种属不同而异。这里介绍三种附属聚合物：(1) 磷壁质 (teichoic acid)；(2) 多糖类和 (3) 多肽或蛋白质。磷壁质(来自希腊文 “teichos”，意为“城墙”)在革兰氏阳性细菌的细胞壁中占到干重的20—40%，是甘油或核糖醇分子彼此以磷酸二酯桥连接的聚合链。在一种类型的磷壁质中(图 10-33)，其磷酸甘油骨架上交替的游离羟基被 D-丙氨酸和 D-葡萄糖或 N-乙酰-D-氨基葡萄糖残基二者之一占据着，附属的多糖类

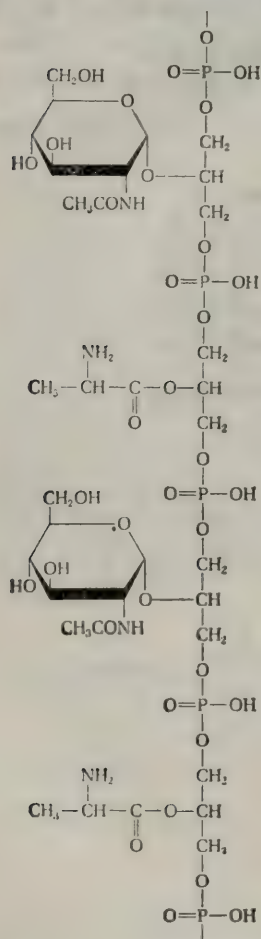


图 10-33 一个磷壁质的节段所含交替出现的 D-丙氨酸和 N-乙酰氨基葡萄糖残基

含鼠李糖、葡萄糖、半乳糖或甘露糖(或其氨基化物)，因种属不同而异。它们可以是细长的或形成硬的、韧性的囊。细菌细胞壁的磷壁质和多糖具有抗原性，这种性质对于细菌分类学上的分类非常有用。

革兰氏阴性细胞如大肠杆菌的壁，要比革兰氏阳性细胞复杂得多。它们的附加成分是由多肽、脂蛋白和特别是一种很复杂的脂多糖组成的，对这种脂多糖的结构现在才开始有所了解，它有一个三糖骨干的重复单位，由二个庚糖(七碳)和辛酮糖酸(一种八碳糖酸)组成，在此主干上接有低聚糖旁链和脂肪酸  $\beta$ -羟基豆蔻酸，由它赋予此复杂结构以脂类性质。脂多糖形成一外部的脂质膜，并为革兰氏阴性细胞提供了复杂的抗原特异性。革兰氏阳性菌的细胞壁使人想起像一个硬的、易碎的盒子，像甲壳类动物的外壳。反之，革兰氏阴性菌的细胞壁则有一外部的富于脂类的皮，里面包藏着硬的肽聚糖骨骼。

### 动物组织的细胞外膜与基质

脊椎动物组织的细胞并无硬壁包裹，这大概是由于它们并不需要防御外界渗透压的巨大变化。然而它们却具有一外膜，在某些方面可与细胞壁相比。电子显微镜常常发现在某些动物细胞的细胞膜外面还有微纤毛状或绒毛状的外膜(图 10-34)。这种外膜是柔软的、有弹性的和有粘附性的。

虽然已经知道动物细胞外膜的某些重要成分的化学性质，但却很少关于这些成分在细胞外表面是如何排列的资料。这是个重要的研究领域，因为动物组织内细胞参与对

其邻居特有的接触。例如将肾脏细胞彼此分开后，再在组织培养基中生长，它们也能从肝和肾细胞的混合物中彼此互相找出，并重新结合，这大概是因为在其表面含有特殊的细胞对细胞的识别位点。而且正常哺乳动物细胞在组织培养基中生长时是受到接触抑制或密度抑制现象限制的。正常细胞生长是有秩序的，因此当它的大多数表面在与邻近细胞接触很近时，任何已知细胞的分裂就受到抑制。另一方面，在培养癌细胞时，它们就不易受到接触抑制，这是导致无秩序的细胞堆积的一种条件。而且在癌细胞的外膜含有不见于正常细胞的特殊抗原。细胞外膜也是细胞抗体和组织抗体的部位，包括像一定生物体



拒绝移植或嫁接的组织时所涉及的抗体。细胞表面还涉及许多其他类型的细胞内反应，例如神经系统的神经元之间突触的接触。

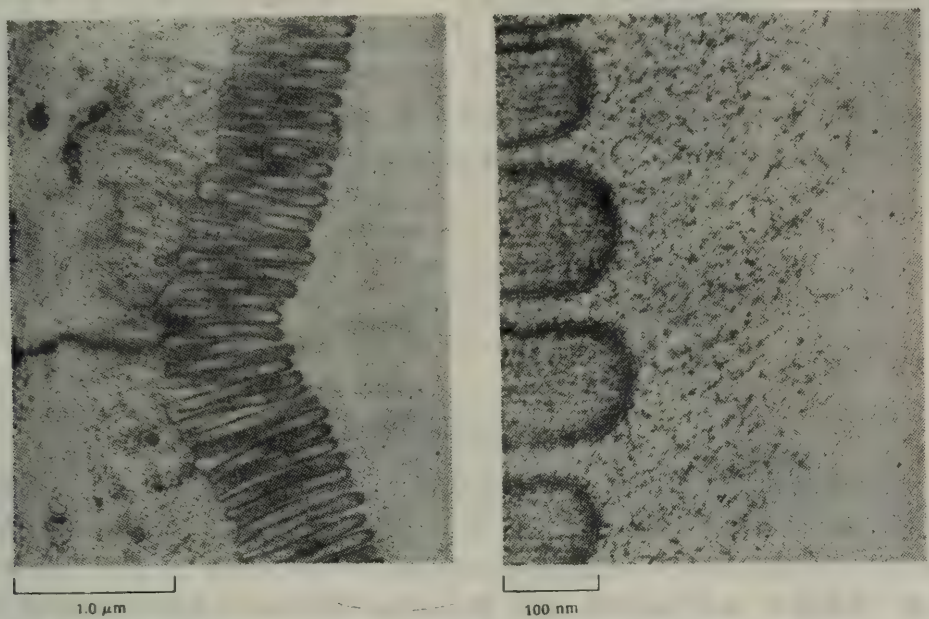


图 10-34 猫小肠上皮细胞吸收表面的电子显微镜图，在绒毛的尖端显示多糖细胞外膜或糖萼（左）。在较高度放大之下，显示出丝状的网状结构，常称之为“绒毛外膜”。（右）

高等生物的细胞外膜的主要成分是由（1）糖鞘脂类（归在第十一章讨论）；（2）酸性粘多糖类和（3）糖蛋白类组成。

酸 性 粘 多 糖

酸性粘多糖是一组相关的杂多糖，通常含有两种类型交替出现的单糖单位，其中至少一个有酸性基，或为羧基或为硫酸根（表 10-2）。当它们以与特殊蛋白质络合而存在时则称为粘液素或粘蛋白；在这类蛋白质中，多糖构成其重量的最大部分。粘蛋白是胶状的、粘稠或滑腻的物质，有些起润滑作用，有些则起有弹性的细胞内粘合剂作用。

表 10-2 酸性粘多糖

多 糖	组 成 成 分	存在部位
透明质酸	葡萄糖醛酸，N-乙酰-D-氨基葡萄糖	关节液
软骨素	葡萄糖醛酸，N-乙酰-D-氨基半乳糖	角膜
4-硫酸软骨素	葡萄糖醛酸，N-乙酰-D-氨基半乳糖 4-硫酸酯	软骨
硫酸皮肤素	艾杜糖醛酸，N-乙酰-D-氨基半乳糖 4-硫酸酯	皮肤
硫酸角蛋白	半乳糖，6-硫酸半乳糖，N-乙酰-D-氨基葡萄糖-6-硫酸酯	角膜
肝素	氨基葡萄糖-6-硫酸酯，2-硫酸葡萄糖醛酸，艾杜糖醛酸	肺

最丰富的酸性粘多糖是透明质酸，存在于细胞外膜和脊椎动物结缔组织的细胞内基质中；它们也出现于关节的滑液中和眼的玻璃体液中。透明质酸的重复单位是一个由 D-葡萄糖醛酸和 N-乙酰-D-氨基葡萄糖通过  $\beta$ -(1  $\rightarrow$  4) 键连接组成的双糖(图 10-35)。由于每个双糖单位是通过  $\beta$ (1  $\rightarrow$  4) 键与下一个双糖连接的，因此透明质酸含有交替出现的  $\beta$ (1  $\rightarrow$  3) 和  $\beta$ (1  $\rightarrow$  4) 糖苷键。透明质酸是一种线性聚合物。由于它的羧基是完全游离的，故在 pH 7.0 时带负电荷。透明质酸能溶于水，并在其中形成高度粘稠溶液。透明质酸酶催化透明质酸的  $\beta$ (1  $\rightarrow$  4) 糖苷键的水解，随着水解粘度降低。

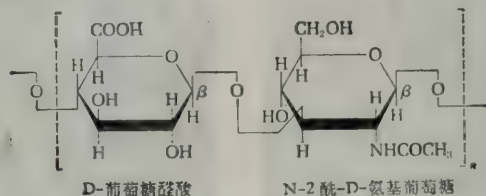


图 10-35 透明质酸的重复单位

另一种酸性粘多糖是软骨素，在结构上软骨素与透明质酸几乎相同，唯一不同的是它含有 N-乙酰-D-氨基半乳糖而不是 N-乙酰-D-氨基葡萄糖残基。软骨素本身仅是细胞外物质的一个不重要的成分，但它们的硫酸衍生物，4-硫酸软骨素（软骨素 A）和 6-硫酸软骨素（软骨素 C）则是细胞外膜、软骨、骨、角膜和脊椎动物的其他结缔组织的重要构成成分。硫酸皮肤素和硫酸角蛋白（表 10-2）是存在于皮肤、角膜和骨组织的酸性粘多糖。另一种有关的酸性粘多糖是肝素，能防止血液凝固，存在于肺和动脉壁。

近来有人发现某些酸性粘多糖含有元素矽，矽是鼠和小鸡的营养所必需，它是以共价键的形式结合在多糖上的。

## 糖 蛋 白

在几类不同的结合蛋白中，糖蛋白是那种在多肽链上通过共价键接有糖基的，代表一大群分布很广且有重要生物学意义的蛋白质。事实上，许多蛋白质过去认为是简单蛋白质，例如仅有氨基酸残基，在较严密的研究下，也发现含有糖基。表 10-3 列出几种重要类型的糖蛋白在生物学上的分布，在不同的糖蛋白中，其糖基的重量百分数，从小到只有百分之一的卵清蛋白到高达 80% 的粘蛋白，是很不相同的，有很高糖含量的糖蛋白又称为蛋白多糖。

糖蛋白存在于各种形式的生命中，在脊椎动物，大多数(但不是全部)的糖蛋白的存在和功能是在细胞外的，或是从细胞分泌的，因此表明接上糖残基的目的之一就是标记蛋白质以便从细胞输出。在糖蛋白中，定位在细胞外或功能在细胞外的有细胞外膜糖蛋白、血液糖蛋白、某些蛋白激素的循环形式、抗体、分泌到肠内的各种消化酶、粘液分泌物的粘蛋白和细胞外的基底膜糖蛋白等。

糖蛋白中存在许多不同的单糖和单糖衍生物。糖蛋白的线性的或分支的旁链可能含有两个到成打的单糖残基，通常有两种或更多种的单糖。在单糖单位末端常常是一个带负电荷的 N-乙酰神经氨酸残基，一个涎酸。(图 10-36)



表 10-3 按生物学上的存在分组的某些糖蛋白, 注意大多数糖蛋白都是细胞外的

血浆	酶
胎球蛋白	核糖核酸酶 B
$\alpha_1$ 酸性糖蛋白	$\beta$ -葡萄糖苷酸酶
纤维蛋白原	胃蛋白酶
免疫球蛋白	血清胆硷脂酶
甲状腺素结合球蛋白	粘液分泌物
血型蛋白	颌下糖蛋白
尿	胃糖蛋白
尿糖蛋白	结缔组织
激素	胶原
绒毛膜促性腺激素	细胞膜
促卵泡激素	红细胞膜血型糖蛋白
促甲状腺激素	细胞外膜
	基底膜糖蛋白
	晶状体糖蛋白

大多数糖蛋白的低聚糖基团通过共价接到多肽链中特定氨基酸残基的 R 基团上。共有三种不同类型的键 (图 10-36), 在某些糖蛋白, 例如卵清蛋白和免疫球蛋白, 其低聚糖

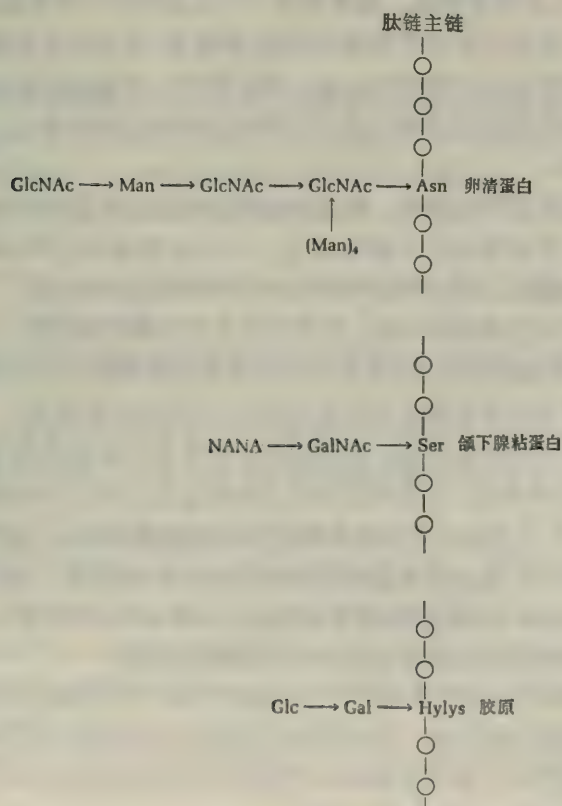


图 10-36 三种有代表性的糖蛋白的低聚糖旁链, 所用的符号为: GlcNAc 是 N-乙酰氨基葡萄糖; GalNAc 是 N-乙酰氨基半乳糖; Glc 是葡萄糖; Gal 是半乳糖; Man 是甘露糖; NANA 是 N-乙酰神经氨酸和 Hylys 是羟赖氨酸。

是经由低聚糖的 N-乙酰-D-氨基葡萄糖与肽链上的一个天冬酰胺残基的酰胺氮之间的氨基糖键连接起来的(图 10-36)。在第二类糖蛋白,包括颌下腺粘蛋白,则在其低聚糖旁链的 N-乙酰-D-氨基半乳糖和一个丝氨酸或苏氨酸残基的羟基之间有一个糖苷键。颌下腺粘液素具有约 28 个氨基酸残基的重复单位,每个重复单位又含有三个低聚糖旁链。以胶原为代表的第三类糖蛋白,其低聚糖旁链接到羟赖氨酸残基的羟基上,仅在少数情况下知道低聚糖旁链上残基的确切顺序。

在南极的鱼类血浆中发现的抗冷冻蛋白质是特别有趣的。它的骨架是由丙-丙-苏重复出现的氨基酸顺序所组成,其半乳糖基-N-乙酰氨基半乳糖的双糖则连接到每个苏氨酸残基上,这些蛋白质的分子量从 10,000 到 23,000 不等,抗冷冻蛋白质在水中具有弹性的、膨大的结构,大概它可以干扰冰的晶格形成。

人类血型蛋白质的低聚糖旁链含有 L-岩藻糖、D-半乳糖、N-乙酰氨基半乳糖和 N-乙酰-D-氨基葡萄糖的残基;这些旁链决定血型的特异性。

## 摘 要

糖类是指具有  $(\text{CH}_2\text{O})_n$  实验式的多羟醛或多羟酮。戊糖 ( $\text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}_5$ ) 和己糖 ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ ) 是最丰富的简单碳水化合物,或称单糖类。糖类具有一个或更多的不对称碳原子,因而以立体异构物的形式存在。大多数天然存在的糖如核糖、葡萄糖、果糖和甘露糖均属 D 系。有五个或更多碳原子的糖可能存在两种异头形态,即在糖的一个羟基和羰基之间形成立体异构的环状半缩醛。这样形成的五员和六员环分别称为呋喃糖和吡喃糖,吡喃糖还可以有船状和椅状的二种构型。

戊糖和己糖与醇反应生成异头糖苷。糖的自由羟基可以全部乙酰化或甲基化,它们的环也能被过碘酸破坏,糖能被还原成糖醇;它们又可以在醛基碳上氧化而得到糖酸;在伯醇羟基上氧化的得到糖醛酸,而在两端碳原子上氧化的则得到糖二酸。

双糖是两个单糖通过糖苷键连接而成,麦芽糖含有两个葡萄糖残基,以  $\alpha(1 \rightarrow 4)$  键连接,纤维二糖亦含有二个葡萄糖残基;乳糖含有半乳糖和葡萄糖,而蔗糖则含有葡萄糖和果糖。在蔗糖里两个单糖的异头碳原子都彼此结合,因而不能被氧化。

多糖(聚糖)从化学上分类有同多糖,即只含有一种重复出现的单糖单位(例如糖原,是葡萄糖的聚合物),以及杂多糖,即含有两种或更多种重复出现的单糖单位(例如,透明质酸是 D-葡萄糖醛酸和 N-乙酰-D-氨基葡萄糖交替出现的聚合物)。也可以从功能上将它们分为储存多糖和结构多糖。最重要的储存多糖是淀粉和糖原,它们是分支的、葡萄糖的聚合物,在链上有  $\alpha(1 \rightarrow 4)$  糖苷键,而在分支点上则有  $\alpha(1 \rightarrow 6)$  键。纤维素是最重要的结构多糖,是由 D-葡萄糖单位通过  $\beta(1 \rightarrow 4)$  键连接而成。

细菌细胞壁含有肽聚糖(胞壁质),是 N-乙酰胞壁酸和 N-乙酰氨基葡萄糖组成的杂多糖,具有含 D-氨基酸的交联短肽。高等植物细胞壁含有纤维素、其他多糖和蛋白质。动物细胞具有弹性的细胞外膜,其中有和蛋白质联接在一起的酸性粘多糖。糖蛋白有三类,可以用低聚糖旁链连接的氨基酸残基来区别。



## 参 考 文 献

### 书籍

- Advances in Carbohydrate Chemistry*, 1945 to present. Annual review series.  
Bailey, R. W.: *Oligosaccharides*, Macmillan, New York, 1965. Comprehensive reference work on structure, preparation, and chemistry.  
Davidson, E. A.: *Carbohydrate Chemistry*, Holt, New York, 1967. An excellent survey.  
Florkin, M., and E. H. Stotz (eds.): *Carbohydrates*, sec II, vol. 5 of *Comprehensive Biochemistry*, American Elsevier, New York, 1963. Reference treatise.  
Gottschalk, A. (ed.): *Glycoproteins: Composition, Structure, and Function*, 2d ed., 2 vols., Elsevier, Amsterdam, 1972. Comprehensive reference work.  
Jeanloz, R. W., and E. A. Balasz (eds.): *Amino Sugars*, vols. 1 and 2, Academic, New York, 1965.  
Pigman, W. W., and D. Horton (eds.): *The Carbohydrates*, vols. 1A and 1B, Academic, New York, 1972.  
Quintarelli, G. (ed.): *The Chemical Physiology of Mucopolysaccharides*, Little, Brown, Boston, 1967.

### 论文

- Baddiley, J.: "Teichoic Acids in Cell Walls and Membranes of Bacteria," *Essays Biochem.*, 8: 35—78 (1972).  
Devries, A. L., J. Vandenheede, and R. E. Feeney: "Primary Structure of Freezing-Point Depressing Glycoproteins," *J. Biol. Chem.*, 246: 305—308 (1971).  
Heath, E. C.: "Complex Polysaccharides," *Ann. Rev. Biochem.*, 40: 29—56 (1971).  
Marshall, R. D.: "Glycoproteins," *Ann. Rev. Biochem.*, 41: 673—702 (1972).  
Spiro, R. G.: "Glycoproteins: Their Biochemistry, Biology, and Role in Human Disease," *NE J. Med.*, 281: 991—1001, 1043—1056 (1969). Excellent short account.

## 习 题

1. 取 80 毫升新鲜配制的 10%  $\alpha$ -D-葡萄糖溶液与 20 毫升新鲜配制的  $\beta$ -D-葡萄糖溶液混合。试测定: (1) 此混合液最初的比旋光度 ( $[\alpha]_D^{25}$ ) 和 (2) 经过若干小时后的旋光度。 (3) 以 50 毫升甲基- $\alpha$ -D-葡萄糖苷和 50 毫升甲基- $\beta$ -D-葡萄糖苷混合后同样作上述测定。
2. 试命名下述产物: (1) 以过量乙酸酐处理  $\alpha$ -D-半乳糖和 (2) 以硫酸二甲酯处理  $\alpha$ -D-葡萄糖, 随后再轻度水解。
3. 试命名下述产物: (1) 以钠汞齐在水中处理 D-半乳糖; (2) 以硝酸氧化 L-甘露糖和 (3) 经彻底甲基化以后的 D-氨基半乳糖。
4. (1) 试命名乳糖经彻底甲基化作用后的水解产物; (2) 蔗糖在彻底甲基化作用后的水解产物又是什么?
5. 用酸水解某种三糖, 得到 2:1 的 D-葡萄糖和 D-半乳糖。经彻底甲基化作用后再水解时, 得到 2, 3, 6-三-O-甲基半乳糖; 2, 3, 4, 6-四-O-甲基葡萄糖和 2, 3, 4-三-O-甲基葡萄糖, 试命名此三糖。
6. 一种多糖经过彻底甲基化作用和水解后, 产生等克分子量的 2, 3, 4-三-O-甲基葡萄糖和 2, 3, 6-三-O-甲基葡萄糖。这多糖有一个还原性末端。试写出其结构。
7. 有一个 10.0 克的糖原样品, 经过甲基化和水解后能产生 6 毫克分子的 2, 3-二-O-甲基葡萄糖。问: (1) 出现在 1 $\rightarrow$ 6 分支点上的葡萄糖残基百分数是多少? (2) 每个支链上葡萄糖残基的平均数是多少? (3) 产生了多少毫克分子的 2, 3, 6-三-O-甲基葡萄糖? (4) 如果这多糖的分子量是  $2 \times 10^6$ , 其所含葡萄糖残基是多少?
8. 用过碘酸盐处理 100 毫克纤维素样品, 产生 0.0015 毫克分子的甲酸。问此纤维素的近似链长是多少?

【周衍椒译 任邦哲校】

## 第十一章 脂类、脂蛋白与膜

脂类是不溶于水的有机生物分子,用非极性溶剂如氯仿、乙醚和苯能从细胞和组织中提取。脂类有几种不同族或类,但它们的特殊性质都是从其结构中主要部分即烷的本质衍生出来的。脂类有几种重要的生物功能:用作(1)膜的结构成分,(2)代谢燃料的储存和运输形式,(3)许多生物表面的保护外层,(4)为细胞辨认种族特异性,以及免疫有关的细胞表面成分。某些属于脂类的物质具有强烈的生物活性,它们包括某些维生素与激素。

虽然脂类是一群特殊的生物分子,但我们将会知道它们常通过共价键、或者弱键与别类生物分子结合,产生杂种分子如:糖脂,它们含有糖基和脂基;以及脂蛋白,它们含有脂类和蛋白质。在这些生物分子中,其组分的特殊化学和物理性质混合起来以满足特殊化了的生物功能。

### 脂 类 的 分 类

脂类有几种不同的分类方法。最好的分类法是以它们的骨架结构为基础的(表 11-1)。复杂脂类,其特点是含有脂酸组分,包括酰基甘油类,磷酸甘油酯类,鞘脂类,与蜡类。它们的骨架结构各不相同,脂酸通过共价键与骨架结构相连。由于用硷水解时能产生肥皂(脂酸的盐)所以称它们为可皂化脂类。简单脂类组成另一大类,它们不含脂酸故不能皂化。

表 11-1 脂 类 的 分 类

脂的类型	骨架
复杂(可皂化)	
酰基甘油类	甘油
磷酸甘油酯类	3-磷酸甘油
神经鞘脂类	神经氨醇
蜡类	高分子量的非极性醇类
简单(非皂化)	
萜类	
固醇类	
前列腺素类	

我们首先讨论所有复杂脂类的特有组分脂肪酸的结构和性质。

### 脂 肪 酸

虽然脂肪酸作为组成可皂化脂类的基本单位而极大量地存在于细胞和组织里,但游



$$\text{HO} \quad \text{O} \quad \text{HO} \quad \text{O}$$



图 11-1 两种普通脂肪酸

烃链或者饱和如棕榈酸的,或者有一个或更多双键如油酸的,很少几种脂肪酸含有三键。各种脂肪酸的区别主要在于链的长度,以及它们未饱和键的数目和位置不同。通常可以用缩写符号表示它们碳链的长度以及双键的数目、位置和构型。如棕榈酸(16 碳,饱和)的符号为 16:0,而油酸[18 碳和一个双键(顺)在碳 9 和 10 之间]的符号为 18:1<sup>Δ9</sup>。除非标明了是别样的,双键一般公认为顺式。表 1I-2 列出某些重要的饱和与不饱和脂肪酸的结构与符号,以及几种结构不寻常的脂酸。

对高等动植物的不同脂肪酸可以作出某些概括。数量最多的脂肪酸具有偶数碳原子,链长 14—22 个碳原子,但又以 16 碳或 18 碳脂酸占优势。饱和脂肪酸中最常见的是棕榈酸 ( $C_{16}$ ) 和硬脂酸 ( $C_{18}$ ), 而在不饱和脂肪酸中则为油酸 ( $C_{18}$ )。特别是在高等植物和生活在低温下的动物里, 不饱和脂肪酸超过饱和脂肪酸。不饱和脂肪酸的熔点比相同链长饱和脂肪酸的低 (表 11-2)。高等生物里大多数含有一个双键(单烯)的脂酸, 其双键都在碳原子 9 和 10 之间。大多数含多个双键(多烯)的脂酸, 有一个双键在第 9 和第 10 碳原子之间, 额外的双键则通常在 9, 10 双键与链的甲基末端之间。大多数种类的多烯脂酸, 其双键被一个甲烯基隔开, 例如  $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$ , 只有少数几种植物脂肪酸的双键是共轭的, 即  $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-$ 。几乎所有天然存在的各种不饱和脂肪酸其

表 11-2 某些天然存在的脂肪酸

符 号	结 构	系统命名	普 通 名	熔点℃
	饱和脂肪酸			
12:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$	正十二烷酸	月桂酸	44.2
14:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$	正十四烷酸	肉豆蔻酸	53.9
16:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$	正十六烷酸	棕榈酸	63.1
18:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$	正十八烷酸	硬脂酸	69.6
20:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{COOH}$	正二十烷酸	花生酸	76.5
24:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{22}\text{COOH}$	正二十四烷酸	二十四烷酸	86.0
	未饱和脂肪酸			
16:1 $\Delta^9$	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_9\text{COOH}$		棕榈油酸	-0.5
18:1 $\Delta^9$	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_9\text{COOH}$		油酸	13.4
18:2 $\Delta^9,11$	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$		亚油酸	-5
18:3 $\Delta^9,12,15$	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2\text{CHCH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$		亚麻酸	-11
20:4 $\Delta^5,8,11,14$	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4[\text{CH}=\text{CHCH}_2]_4\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$		花生四烯酸	-49.5
16:1 $\Delta^9$ 反	某些不常见的脂肪酸			
18:1 $\Delta^9$ 反	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_9\text{COOH}$ (反)		反-十六碳烯酸	
	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_9\text{COOH}$ (反)		反油酸	
	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{HC}-\text{CH}(\text{CH}_2)_9\text{COOH}$ $\diagup$ $\diagdown$ $\text{CH}_2$		乳杆酸	
	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}(\text{CH}_2)_8\text{COOH}$ $\mid$ $\text{CH}_3$		结核菌硬脂酸	
	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}(\text{CH}_2)_8\text{COOH}$ $\mid$ $\text{OH}$		脑酮酸	

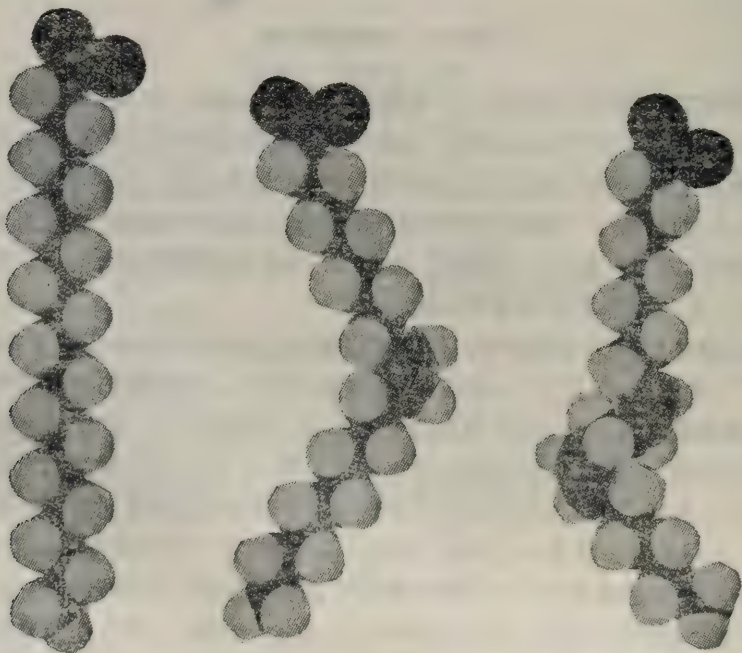


图 11-2 饱和酸、不饱和一烯酸和不饱和二烯酸(阴离子式)的实体模型。



表 11-3 小鼠肝中脂类的脂肪酸成分(%)

饱 和 的	磷 酸 甘 油 脂	三 酰 基 甘 油
肉豆蔻酸	0	0
棕榈酸	28	24
硬脂酸	20	4
不饱和的		
棕榈油酸	4	6
油酸	17	43
亚油酸	12	20
亚麻酸	1	1
花生四烯酸	18	2

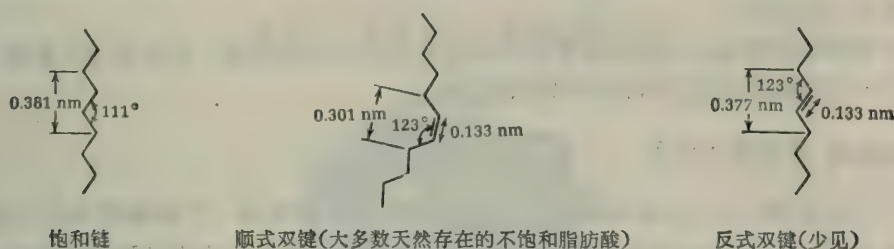


图 11-3 脂肪酸中双键的几何学

双键的几何构型都是顺型,只有很少数是反型的。

细菌所含脂肪酸比高等生物的类型少而且简单,如  $C_{12}$  到  $C_{18}$  饱和酸,某些具有支链甲基(表 11-2),而且也有  $C_{16}$  和  $C_{18}$  的一烯脂酸。细菌中尚未发现具有一个双键以上的脂肪酸。

具有奇数碳原子的脂肪酸在陆生动物中仅有微量存在,但在许多海生生物中却有相当大的数量。

### 必需脂肪酸类

当大鼠正在断乳或尚未成熟时若给以无脂的饮食,则其生长不良,皮肤呈鳞状,脱毛,最后死亡时有多种病症。若饮食中有亚油酸就没有这些情况出现。亚麻酸和花生四烯酸(表 11-2)也能防止这些症状。饱和酸和单烯脂酸无效。已经肯定哺乳类能从其它前身物合成饱和的脂肪酸和单烯脂酸,但不能制造亚油酸和  $\gamma$ -亚麻酸。哺乳动物饮食中必需的脂肪酸称为必需脂肪酸。哺乳动物里最富有的必需脂肪酸是亚油酸,它占动物三酰基甘油和磷酸甘油的脂肪酸总量的 10—20%。亚油酸和  $\gamma$ -亚麻酸是哺乳动物所不能合成的,必须从非常富含它们的植物中获得。花生四烯酸植物中不存在,亚油酸是哺乳动物生物合成它的必需前身物。

虽然多年来对必需脂肪酸在哺乳类中的特殊功用是什么还是一个谜,但已经发现它的一个功用。必需脂肪酸是生物合成一组脂酸衍生物(称为前列腺素)所必需的前身物,这些脂酸衍生物,微量的前列腺素,对许多重要生理活动都有显著的功效,它是一种类似激素的化合物。

## 脂肪酸的理化性质

饱和与不饱和脂肪酸具有十分不同的构象,饱和脂肪酸的烃尾是容易弯曲的,因为它的骨架中每个单键都能完全自由转动,故它能以很多种构象存在。图 11-2 所示为完全伸展的形式,即最小能量形式,是饱和脂肪酸最可能的构象。另一方面不饱和脂肪酸表现出一个或更多的硬结,这是由不能转动的双键引起的。双键顺式的构型在脂族链中(图 11-2)产生约  $30^\circ$  的弯曲,而反式构型则更近似于饱和链的伸展形式(图 11-3)。

用顺式不饱和脂肪酸与一定催化剂一同加热可以转变为反式。用这种办法很容易将油酸转变成熔点高甚多的反式异构物反油酸(表 11-2)。虽然反油酸不是一种天然存在的脂肪酸,但在制造半固体烹饪脂肪和人造奶油时触媒氢化液体植物油的步骤中,有颇大数量的反油酸形成。曾经在人类组织的脂类中发现过反油酸,可能是由于食用了那种商业上氢化了的产物。

不饱和脂肪酸在它们的双键处能进行加成作用。用碘或溴一类卤素作定量滴定,可以测出一定脂肪酸或脂类样品中双键的数量。

## 脂肪酸的气-液色层分析法

分析由水解天然脂类所得到的脂肪酸复杂混合物,曾经是一个极端困难的问题,但是现在像表 11-3 中列出的脂肪酸混合物能用气-液色层分析法作出很精确很灵敏的分析。在这个方法里首先将脂肪酸变成一种更加容易挥发的形式,通常是变成它们的甲酯。为在流动气相和静止液相之间对甲酯蒸气混合物作分配层析,把氮气这样的惰性运载气体用作流动相。静止液相是用高熔点多酯或硅聚合物涂在硅藻土粒上或涂在一条长的加热的毛细管内表面上。不同脂肪酸的甲酯按它们各自的气-液分配系数分布于流动气相与静止液相之间。气相中被分离的甲酯脱离开柱时可用极灵敏的各种侦察器测定。在火焰离子化侦察器中,含有脂酸酯的运载气流与氢和空气的气流混合,并在高压电场里燃烧。火焰中由离子化的脂肪酸碎片流所产生的电流将自动地记录在图表上,表现出一系列分开的高峰。每个高峰相当于一个分离的脂肪酸,峰下的面积与数量成正比。用这种方式能把极复杂的脂肪酸混合物分离开且能定量;分析所需的样品数量不到一毫克。气-液层析法也能用来分析固醇类和烃类混合物,以及那些在合理的温度(达到  $350^\circ\text{C}$ )下是能挥发的或经化学变化能转变成可挥发的衍生物。

## 三酰基甘油(甘油三酯)

甘油醇的脂酸酯(图 11-4)称为酰基甘油或甘油酯;有时它们也被称作“中性脂肪”,这名称已经不用了。甘油的三个羟基全都与脂肪酸酯化时,这个结构就称为三酰基甘油(图 11-4 与 11-5)(虽然习惯上常用甘油三酯以称呼这些化合物,但国际命名委员会已经建议不再用这个在化学上不确切的名称)。三酰基甘油是脂类中最丰富的一族,是动植物细胞里储存或库存脂类的主要组分。在室温下为固体的三酰基甘油常称为“脂肪”,而那些是液体的则称为“油”。二酰基甘油(也称甘油二酯)与一酰基甘油(或甘油一酯)也存在于自然界,但数量少得多。



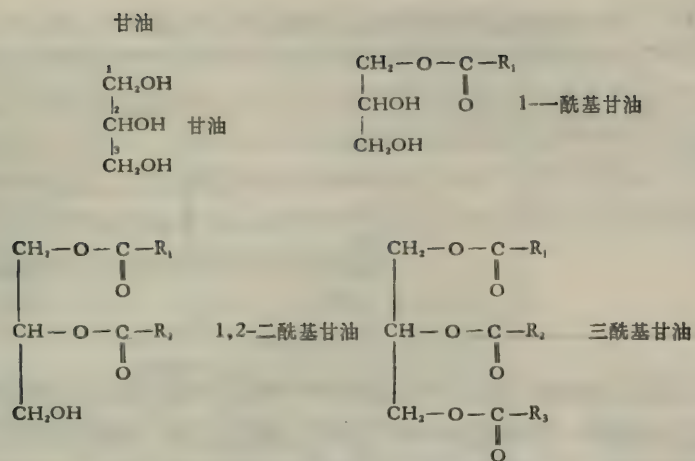


图 11-4 甘油与一酰基、二酰基和三酰基甘油。

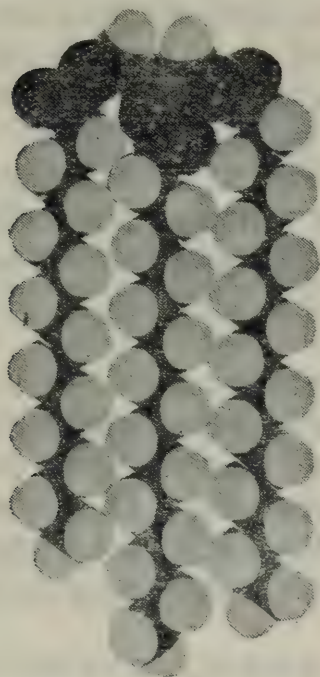


图 11-5 1-肉豆蔻酰二棕榈酰甘油, 一种混合三酰基甘油的实体模型。

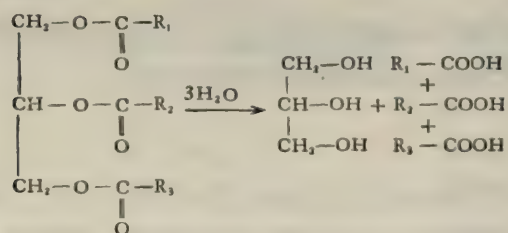


图 11-6 三酰基甘油的水解

表 11-4 存在于大鼠储脂里的简单和混合的三酰基甘油 (S—饱和, U—不饱和)

类 型	符 号	克 分 子 %
简单的	SSS	0.3
	UUU	61.8
混合的	SSU	4.1
	SUS	1.6
	SUU	19.5
	USU	12.8

三酰基甘油按其能与甘油酯化的三个脂肪酸组分的同一性与位置而有许多不同的类型。那些在三个位置上都是单一种脂肪酸的称为简单三酰基甘油,按照它们所含脂肪酸而命名。例如三硬脂酰甘油,三棕榈酰甘油和三油酰甘油;更常用的俗名,分别为三硬脂精,三棕榈精,和三油精。混合三酰基甘油含有两种以上不同的脂肪酸。含有两种不同脂肪酸 A 和 B 的三酰基甘油可能有六种不同的异构形, BBA, AAB, ABA, ABB, BAA 和 BAB, 其中有四个 (AAB, BAA, ABB, BBA) 是立体异构体混合三酰基甘油的命名可用 1-棕榈酰二硬脂酰甘油(俗名为 1-棕榈酰二硬脂精)为例来说明。大多数天然脂肪是单纯和混合三酰基甘油极复杂的混合物。

虽然作过许多试探去发现决定天然三酰基甘油里不同脂肪酸分布方式的生物学基本规则,但仍不能作出简单的、无所不包的概括。表 11-4 表明大鼠库脂中各种类型的三酰基甘油的分布。库脂的脂肪酸成分部分地反映出食入脂类的成分。

### 三酰基甘油的性质

三酰基甘油的熔点决定于它们的脂肪酸组分。一般熔点随饱和脂肪酸组分的数目和长度的增加而增加。例如在体温下三棕榈精和三硬脂精是固体,而三油精和三亚油精则是液体。所有三酰基甘油都不溶于水而且它们自己没有形成高度分散的胶粒的倾向。然而,二酰基甘油和一酰基甘油有相当大的极性,因为它们有游离的羟基并因此能形成胶粒。二酰基和一酰基甘油广泛用于食品工业,用以制造更均匀和更易加工的食品;它们十分容易消化并能为生物所利用。酰基甘油能溶于醚、氯仿、苯和热乙醇。它们的比重比水小。

虽然甘油本身无旋光活性,但每当第 1 和第 3 碳原子上的脂肪酸取代基不同时,碳原子 2 就变成不对称。具有一个不对称碳原子的天然三酰基甘油按惯例命名把它们当成是从 L-甘油醛衍生而来。

当三酰基甘油与酸或碱一起煮沸或通过胰液中存在的脂酶的作用即行水解。(图 11-6) 用碱水解称为皂化作用,生成皂类混合物和甘油。

### 薄层层析法

用薄层层析法技术可分离并且鉴定三酰基甘油(图 11-7)。一块约 10 × 10 厘米的平板玻璃上覆盖一层惰性吸附物质,如硅胶或纤维素等的水样泥浆,此浆又含有像巴黎石膏那样的粘合剂。有时加入硝酸银,因为  $\text{Ag}^+$  与不饱和分子形成弱键使得不饱和酰基甘



油比饱和的移行更慢。板放在空气中使干燥，然后烘除剩余的水，留下一薄层均匀的、牢固结合的吸附剂。将要分析的混合物点在平板底部并把平板下端浸泡在密闭箱内盛有适当溶剂的槽中。正如纸层析那样，溶剂由于毛细管作用而上升，而三酰基甘油混合物则分散成为分离的斑点。经 20—30 分钟后溶剂的前沿达到顶端，弄干平板并喷上适宜的指示剂定出分离成分的位置。也可将吸附剂斑块从平板上刮下来然后洗提以回收分离出来的脂类。用此法能分离微量酰基甘油。薄层层析法对于分离和鉴定其它脂类以及氨基酸、核苷酸、糖类的混合物和其它细胞成分也是有用的。

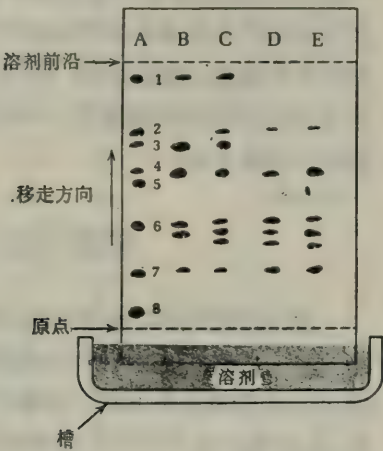


图 11-7 酰基甘油在用 AgNO<sub>3</sub> 饱和过的硅胶上的薄层层析。A—合成混合物，B—猪油，C—可可酱，D—棉子油，E—花生油，斑点(1)三硬脂精，(2)2-油酸二硬脂酸酯，(3)1-油酸二硬脂酸酯，(4)1-硬脂酸二油酸酯，(5)1-亚油酸二硬脂酸酯，(6)三油酸精，(7)三亚油酸精，(8)单硬脂酸酯。

### 烷基醚酰基甘油类

在三酰基甘油类中它们的甘油上三个羟基皆与脂肪酸酯化，此外还有另一类密切关联的甘油脂类即烷基醚酰基甘油类，它们比三酰基甘油的量少多了但却广泛存在。它们含有脂肪酸与甘油的两个羟基酯化；剩余的羟基则以醚键与一长烷链或烯链相连接（图

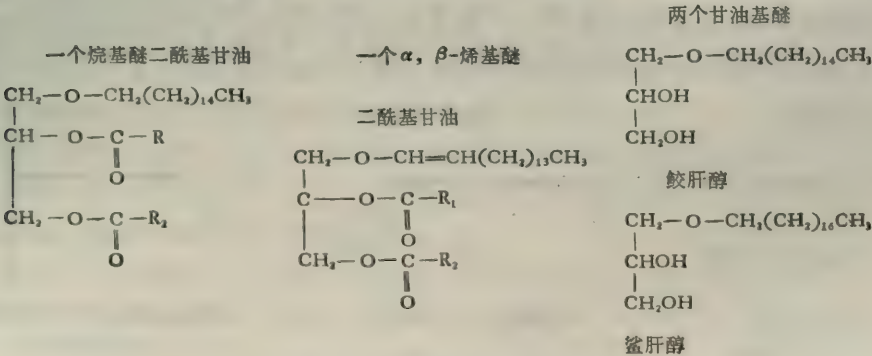
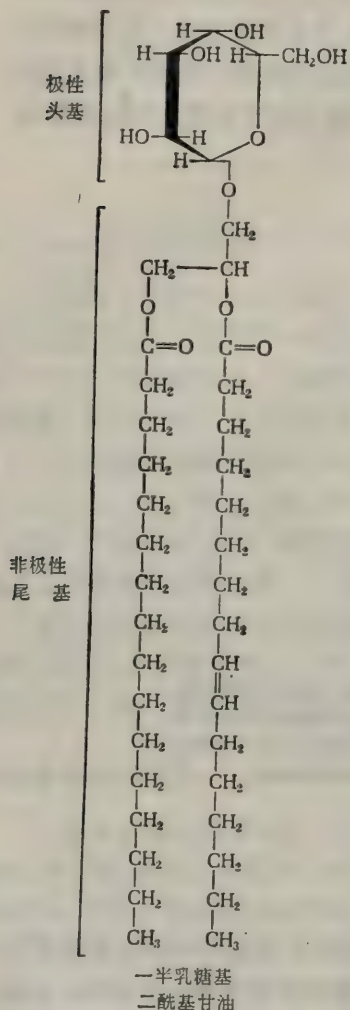


图 11-8 烷基醚酰基甘油与甘油醚

11-8)。这些脂类难从三酰基甘油类中分出；在使用更精确的层析法以前很难测出它们。用碱或酶促轻微水解酯酰基甘油可移除脂酰基得到甘油醚如鲛肝醇和鲨肝醇(图 11-8)，它们分别为甘油的十六烷基醚和十八烷基醚。



## 糖基酰基甘油类

另一类酰基甘油包括糖基二酰基甘油类，它们含有一个糖，与二酰基甘油未酯化的3-羟基通过糖苷键相连接。一个常见的例子就是在高等植物以及脊椎动物神经组织中发现的半乳糖基二酰基甘油(图 11-9)。还知道有些含有二糖或三糖的类似的糖脂类；从细菌中已分离出一种二甘露糖基二酰基甘油。

## 磷酸甘油酯类

复杂脂类的第二大类包括磷酸甘油酯类，也称甘油磷脂类。它们是细胞膜特有的主要组分；细胞的其它处只有很少量磷酸甘油酯存在。磷酸甘油酯也可含糊地称为磷脂，但必须注意并非所有含磷脂类都是磷酸甘油酯类，如鞘磷脂，因为它含有磷是一种磷脂，但由于脂酸连接的骨架结构的本质将它分类为鞘脂类就更好些。

在磷酸甘油酯中甘油伯羟基中的一个与磷酸成酯；其它羟基则皆与脂肪酸成酯。故其母体化合物为甘油的磷酸酯。这一化合物有一个不对称碳原子，可以称为1-磷酸D-甘油或3-磷酸L-甘油。由于这样的混淆不清，故甘油衍生物的立体化学正如图 11-10 所示，是以碳原子的立体特异数(sn)为基础的。存在于天然磷酸甘油酯中的磷酸甘油的异构体称为 sn-3-磷酸甘油，它属于立体化学的 L-系。

除了在第 1 和 2 碳原子上与羟基酯化的两个脂酸残基外，磷酸甘油酯还含有一个极性头基，即一个称为 X-OH 的醇，其羟基与磷酸酯化。

由于磷酸甘油酯类除了其非极性烃尾以外还具有一个极性头基(图 11-11)，故称它

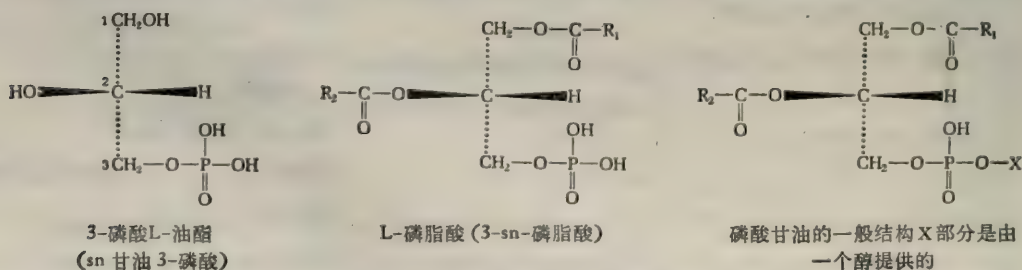


图 11-10 磷酸甘油酯的立体化学构型



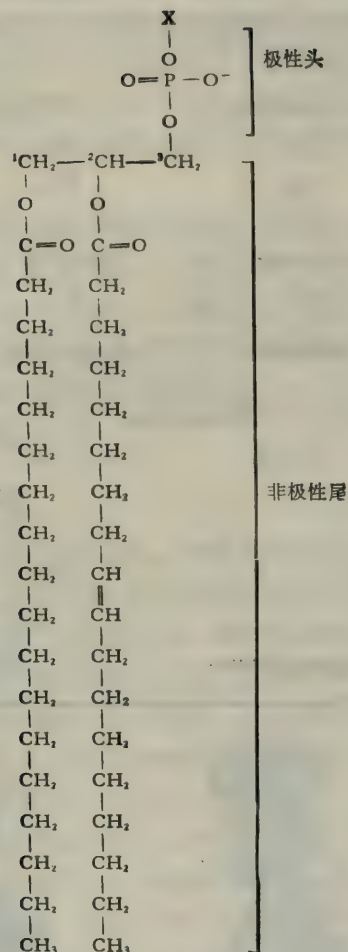


图 11-11 磷酸甘油酯的一般结构，此式强调其亲水脂性质。一般在 2-位上的脂肪酸是不饱和的。

们为亲水脂分子或极性脂类。不同类型的磷酸甘油酯的大小、形状和它们极性头基的电荷都不相同(表 11-5, 图 11-11 与 11-12)。每一类型的磷酸甘油酯能以许多不同的化学种类存在,它们的脂肪酸取代基各不相同。通常有一个饱和的与一个不饱和的脂肪酸,而后者是在甘油的第 2 位置上。

磷酸甘油酯类的母体化合物是磷脂酸(图 11-10), 它没有极性的醇头基,它在细胞中仅有极少量存在,但在磷酸甘油酯的生物合成中它是极重要的中间产物。高等动植物中最丰富的磷酸甘油酯是磷脂酰乙醇胺和磷脂酰胆碱(表 11-5 与图 11-12) 它们分别含有乙醇胺和胆碱两种氨醇作为头基(建议命名这些磷酸甘油酯为乙醇胺磷酸甘油酯和胆碱磷酸甘油酯,但它们并未获得广泛使用。其旧俗名分别为脑磷脂和卵磷脂)。这两种磷酸甘油酯是大多数动物细胞膜的主要组分。

在磷脂酰丝氨酸中 L-丝氨酸的羟基与磷酸酯化。在磷脂酰肌醇中头基就是六碳环状糖醇肌醇。在磷脂酰甘油中头基为甘油分子。磷脂酰甘油常发现在细菌膜中作为一种氨基酸,特别是 L-赖氨酸的衍生物,而赖氨酸则与甘油头基的 3' 位置酯化。这个类型含

氨基酸的脂类称为脂氨基酸或更确切地称为一种 O-氨基酰磷脂酰甘油。(见表 11-5)

表 11-5 磷酸甘油酯的极性头基 (磷酸残基上的开键接在 1,2-二酰基甘油的 3 位上。)

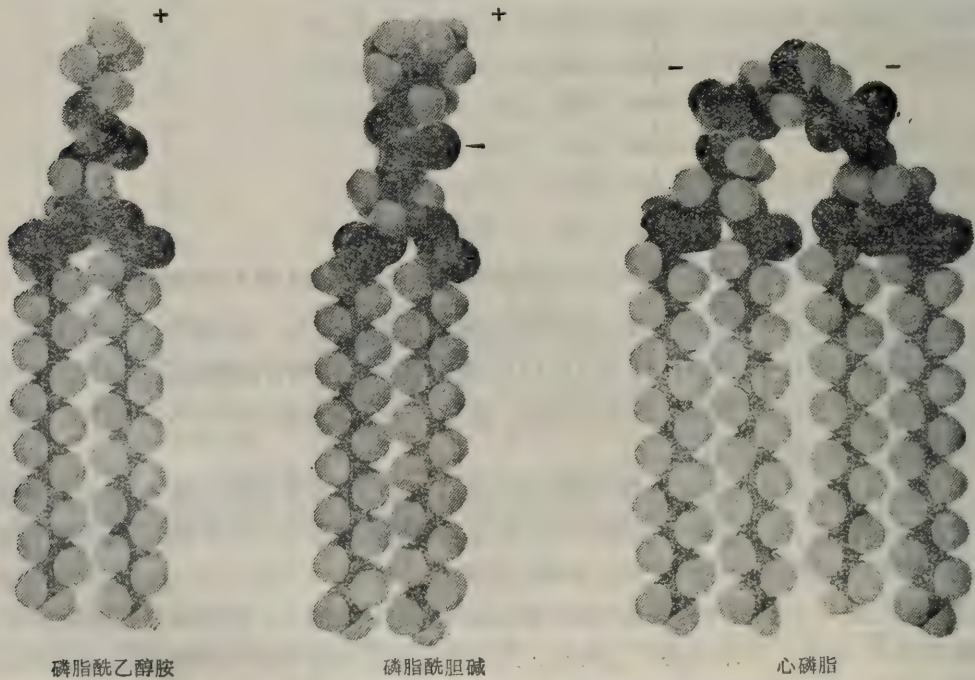
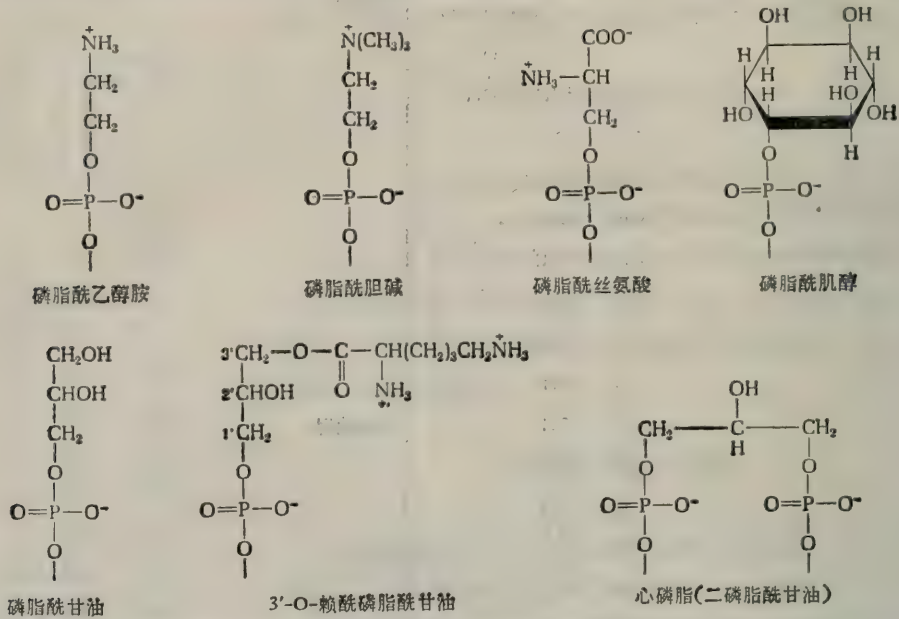


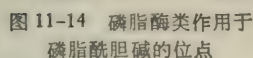
图 11-12 三个磷酸甘油酯的实体模型, 标出带电荷基团的位置。

与磷脂酰甘油紧密相关的是更复杂的脂类, 心磷脂, 也称为二磷脂酰甘油。心磷脂含有一分子磷脂酰甘油, 在其中第二个甘油部分的 3'-羟基与一分子磷脂酸的磷酸根酯化(图 11-12 和表 11-5)。这样, 心磷脂的骨架就含有三分子甘油, 通过两个磷酸二酯键连

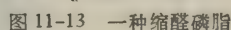


缩醛磷脂不同于上述所有其它磷酸甘油酯。其两烃尾中之一是由长链脂肪酸提供的,在甘油第2位置上酯化,而另一烃尾为一长脂族链在甘油的第1位置上,呈顺式 $\alpha, \beta$ -不饱和醚键(图11-13)。因此缩醛磷脂是上述那些烷基酰基甘油的磷酸甘油酯类似物;乙醇胺是最常见的极性头基,它们在肌肉和神经细胞膜上特别丰富。

在 pH 7 时所有磷酸甘油酯在磷酸根上都有一个负电荷；这个根的  $pK'$  值是在 1—2 的范围内。磷脂酰肌醇、磷脂酰甘油和磷脂酰糖的头基都无电荷，但由于它们含羟基甚多所以极性很大。在 pH 7 的情况下，磷脂酰乙醇胺和磷脂酰胆碱的头基有正电荷；故在此 pH 下这两种磷酸甘油酯是偶极的两性离子具有净电荷。磷脂酰丝氨酸的头基含有一个  $\alpha$ -氨基 ( $pK' = 10$ ) 和一个羧基 ( $pK' = 3$ )，因此磷脂酰丝氨酸分子在 pH 7 时带有两个负电荷和一个正电荷，因此它有一个净负



磷酸甘油酯也可以用特异的磷脂酶水解,这已成了测定磷酸甘油酯结构的重要工具



(图 11-14)。磷脂酶 A<sub>1</sub> 特异性地从第 1 位置上移去脂酸,而磷脂酶 A<sub>2</sub> 则从第 2 位置上移除脂酸。从磷酸甘油酯上除去一分子脂肪酸产生了溶血磷酸甘油酯,如溶血磷脂酰乙醇胺。溶血磷酸甘油酯是磷酸甘油酯代谢的中间产物,但在细胞或组织中只有极少量存在;浓度高时它们对膜是有毒和有损害的。磷脂酶 B,是磷脂酶 A<sub>1</sub> 与 A<sub>2</sub> 的混合物,能引起磷酸甘油酯的两个脂肪酸的连续移除。磷脂酶 C 水解磷酸与甘油之间的键,而磷脂酶 D 则移除极性头基留下磷脂酸。

磷酸甘油酯像下述复杂脂类一样,很容易用薄层层析或硅酸柱层析分离和鉴定。

## 鞘 脂 类

鞘脂类是一种复杂的脂类,在其主链中含有鞘氨醇或一有关碱(图 11-15),是动植物细胞膜的重要组分。它们特别大量地存在于脑和神经组织中,库脂内只有微量鞘脂类。所有鞘脂类都含有三种特殊的基本单位组分:一分子脂肪酸,一分子鞘氨醇或其衍生物之一,以及一个极性头基,这在某些鞘脂类中是很大很复杂的。

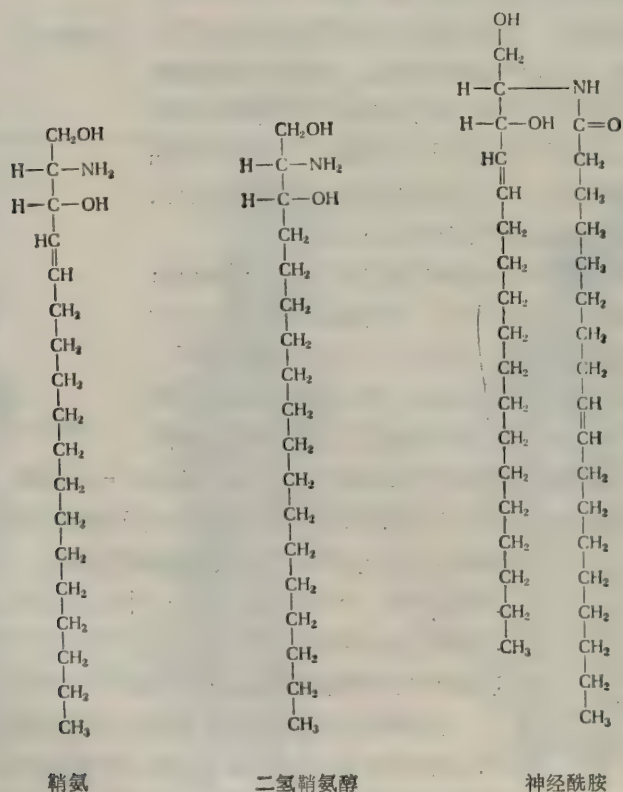


图 11-15 鞘氨醇碱基与神经酰胺

在不同种族的鞘脂类中发现 30 种以上不同的长链氨基醇,鞘氨醇(图 11-15)是其中的一种。在哺乳动物中鞘氨醇(4-sphingenine)和二氢鞘氨醇(sphinganine)是鞘脂类的主要碱基;在高等植物和酵母里则植物鞘氨醇(4-羟二氢鞘氨醇)是主要碱基;在海产无脊



椎动物里双重不饱和的碱基,如 4, 8-鞘氨二烯是常见的。碱基鞘氨醇在其氨基上通过酰胺键与一 18—26 个碳原子的长链饱和或单烯不饱和脂肪酸相连接。形成的化合物具有两个非极性尾,称为神经酰胺(图 11-15),是所有鞘脂类所特有的母体结构。不同的极性头基在鞘氨醇碱基的第 1 位置上与羟基连接。

### 鞘磷脂类

鞘磷脂是高等动物组织中最丰富的鞘脂类,含有磷酰乙醇胺或磷酰胆碱作为它们的极性头基,在神经酰胺的 1-羟基上酯化(图 11-16)。鞘磷脂的物理性质与磷脂酰乙醇胺和磷脂酰胆碱的非常相似,它们在 pH 7.0 时都是两性离子。

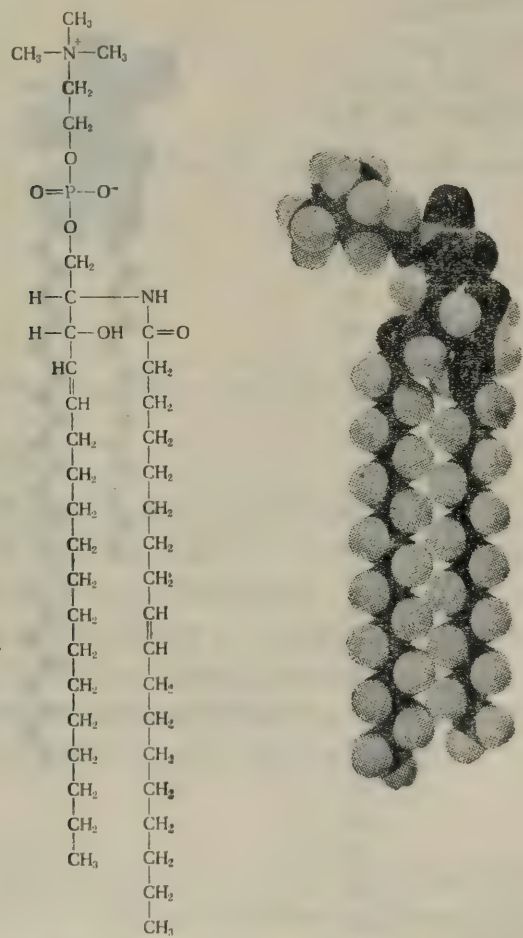


图 11-16 一种有代表性的鞘磷脂的结构

### 中性糖鞘脂类

鞘脂的第二大类含有一个或更多中性糖残基作为其头基,因而不带电荷,称为中性糖鞘脂类。其中最简单的是脑苷脂类,它们含有一个单糖作为其极性头基,这一单糖通过  $\beta$ -糖苷键与神经酰胺的羟基结合(图 11-17)。大脑和神经系统的脑苷脂含有 D-半乳糖

故称为半乳糖脑苷脂。动物的非神经组织中也有较少量的脑苷脂类，由于它们通常含有 D-葡萄糖而不是 D-半乳糖故称为葡萄糖脑苷脂。脑组织中也有半乳糖脑苷脂的硫酸酯（在 D-半乳糖第 3 位上），称为脑硫脂。脑苷脂与脑硫脂通常含有 22—26 个碳原子的脂肪酸。脑苷脂的常见脂肪酸成分是  $\alpha$ -羟廿四烷酸（表 11-2），它在第 2 碳原子上有一个 D-羟基。用碱水解从脑苷脂上切除脂肪酸后，遗留下来的糖基鞘氨醇化合物称为鞘氨醇半乳糖苷。

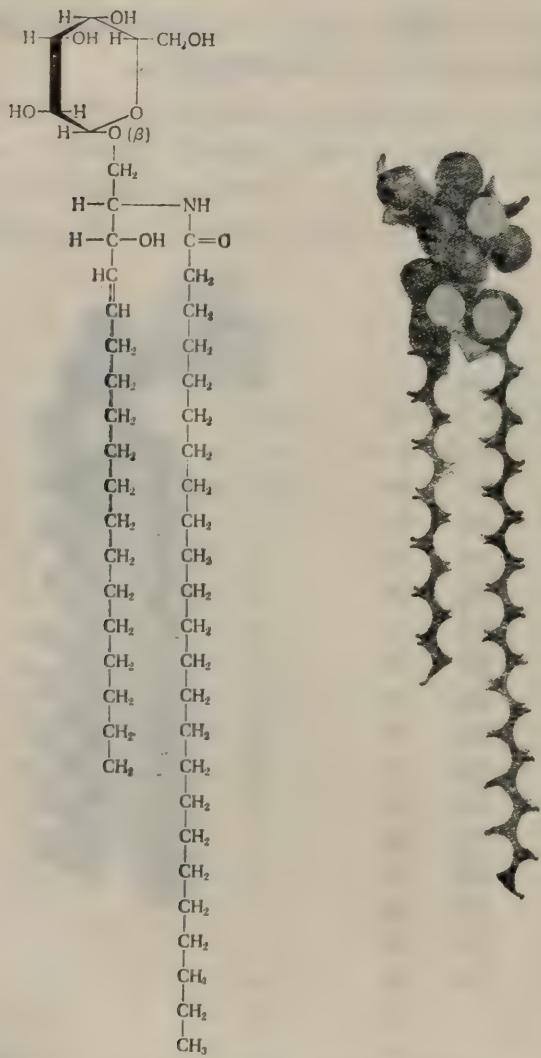


图 11-17 一个含有廿四烷酸 (C<sub>24</sub>) 脂肪酸作为其组分的半乳糖脑苷脂类

以双糖作为其极性头基的中性糖鞘脂类称为二己糖脑苷脂。已知三己糖脑苷脂与四己糖脑苷脂（表 11-6）分别含有三糖和四糖头基。这些糖鞘脂类中存在的单糖有 D-葡萄糖、D-半乳糖、N-乙酰 D-氨基葡萄糖和 N-乙酰-D-氨基半乳糖。中性糖鞘脂类是动物组织里重要的细胞表面组分。它们的非极性尾可能穿入细胞膜脂类双层结构中，而极性



头则从表面向外突出。有些中性糖鞘脂类出现于红细胞的表面并赋予红细胞以血型特异性;这就是为什么输血者与受血者必须配血相合的部分原因。

中性糖鞘脂类的分类是以与神经酰胺连接的糖的本身、糖的顺序以及低聚糖的链长等为依据。表 11-6 列出某些糖鞘脂类的例子。

表 11-6 中性糖鞘脂的主要类别  
符号 GLC, D-葡萄糖; Gal, D-半乳糖; Gal NAc, N-乙酰 D-氨基半乳糖,

葡萄糖基神经酰胺	
单己糖苷(葡萄糖脑苷脂)	$\text{Glc1} \xrightarrow{\beta} \text{神经酰胺}$
二己糖苷	$\text{Gal1} \xrightarrow{\beta} 4 \text{ Glc1} \xrightarrow{\beta} \text{神经酰胺}$
三己糖苷	$\text{Gal} \xrightarrow{\alpha} 4 \text{ Gal1} \xrightarrow{\beta} 4 \text{ Glc1} \xrightarrow{\beta} \text{神经酰胺}$
四己糖苷	$\text{GalNAc1} \xrightarrow{\beta} 3 \text{ Gal1} \xrightarrow{\alpha} 4 \text{ Gal1} \xrightarrow{\beta} 4 \text{ Glc1} \xrightarrow{\beta} \text{神经酰胺}$
半乳糖基神经酰胺	
半乳糖脑苷脂	$\text{Gal1} \xrightarrow{\beta} \text{神经酰胺}$
二己糖苷	$\text{Gal1} \xrightarrow{\beta} 4 \text{ Gal1} \xrightarrow{\beta} \text{神经酰胺}$

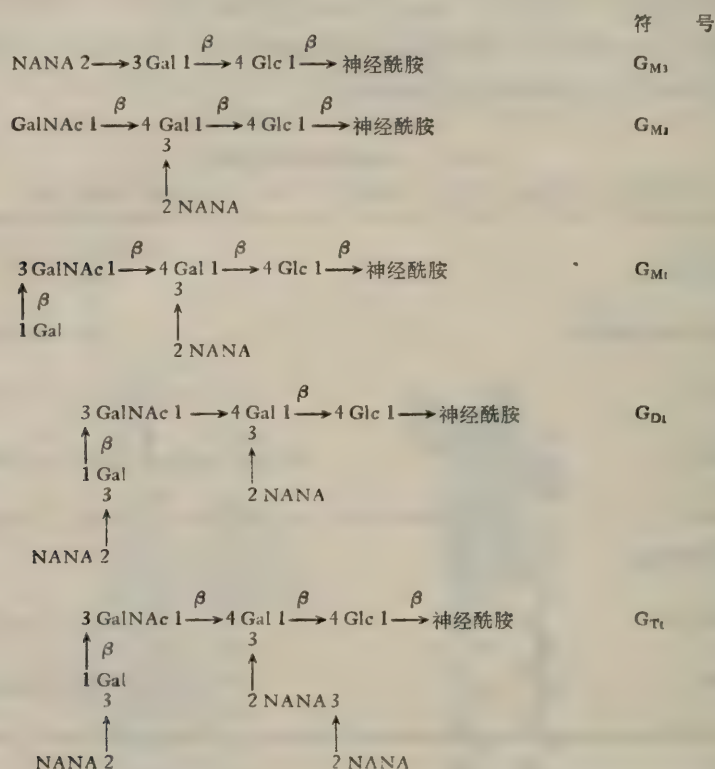
酸性糖鞘脂类(神经节苷脂)

糖鞘脂类中最复杂的第三大类是神经节苷脂;在其低聚糖头基里含有一个或更多个唾液酸残基,它使神经节苷脂的极性头基在 pH 7 时带有一个净负电荷(表 11-7)。在人类神经节苷脂类常见的唾液酸是 N-乙酰神经氨酸。神经节苷脂在大脑灰质中最丰富,它们占脂类总量的 6%,但在非神经组织里也有小量存在。已经鉴定出 20 余种不同类别的神经节苷脂,它们的己糖和唾液酸残基的数目和相对位置各不相同,而这些正是它们分类的基础(表 11-7)。几乎所有已知的神经节苷脂都有一个葡萄糖残基通过糖苷键与神经酰胺相连,还存在着 D-半乳糖与 N-乙酰 D-氨基半乳糖残基。

糖鞘脂类的功用

目前注意力集中于糖鞘脂类的生物化学。虽然它们只是膜的次要成分,但它们似乎在很多特殊功能中都非常重要,因为在神经末梢神经节苷脂特别丰富,曾设想它们在神经冲动经突触传导中起作用。也曾认为它们存在于乙酰胆碱与其它神经介质的受点上。某些细胞表面糖鞘脂类不仅与血型特异性有关,而且也与器官及组织特异性有关。这些复杂脂类也与组织免疫性以及细胞-细胞识别部位有关,后者对组织的发育和结构是最根本的。例如癌细胞有特殊的糖鞘脂类与正常细胞中的不同。Tay-Sachs 病患者脑中堆积神经节苷脂  $\text{G}_{\text{M}2}$  是因为遗传缺失降解它所需的酶。还有几种其它遗传缺陷疾病造成不同的糖鞘脂类的异常堆积。

表 11-7 某些神经节苷脂的结构†



† Glc=D-葡萄糖, Gal=D-半乳糖, GalNAc=N-乙酰-D-氨基半乳糖, NANA=N-乙酰神经氨酸(涎酸)。在这个由 L. Svennerholm 设计的神经节苷脂命名法中写在下边的字母表示涎酸基数目(M=单涎, D=双涎, T=三涎)。写在下边的数字是5-n, n是中性糖残基的数目,涎酸残基用黑体表示。

## 蜡 类

蜡是不溶于水的、由高级脂肪酸与长链单羟脂肪族醇或与固醇类(见后)形成的固体酯类,它们在热时是软的易弯曲的,而冷时则坚硬。蜡存在于皮肤、皮毛和羽毛上,高等植物叶和果上,以及许多昆虫的外骨架上作为保护性外壳而存在。蜂蜡的主要成分是棕榈酸与具有 26—34 个碳原子的长链脂肪族醇的酯。羊毛脂是羊毛固醇和 agno 固醇(见后)的脂酸酯的混合物。

## 简单的(非皂化的)脂类

到此为止以上所讨论的脂类都含有脂肪酸作为结构单位,它可用碱水解释放。简单脂类不含脂肪酸。它们存在于细胞和组织里的量比复杂脂类少,但它们包括许多具有很大生物活性的物质,如维生素、激素以及其它高度特殊化了的脂溶性生物分子。

非皂化脂类有两大主要类别,即萜类与类固醇类。虽然认为它们是特殊的两类是合



适的,但由于它们最终都是从五碳结构单位衍生的,所以在结构上它们是密切相关的。

萜类

萜类是由许多个五碳烃异戊二烯(2-甲基-1,3丁二烯)(图 11-18)所构成。含有两个异戊二烯单位的萜称为单萜,含有三个异戊二烯的称为倍半萜,含有四个、六个和八个单位的则分别称为二萜、三萜和四萜。萜可以是线状分子或为环状分子,有些萜两种结构都有。萜类的连续异戊二烯单位通常是按头尾连接排列的,尤其在线状部分是如此,但有时异戊二烯单位是呈尾-尾排列的。大多数萜的线状部分中的双键是稳定的反式构型,但在有些萜里,特别是在维生素 A 及其前身物  $\beta$ -胡萝卜素(见后)里,有一个或更多个顺式双键。

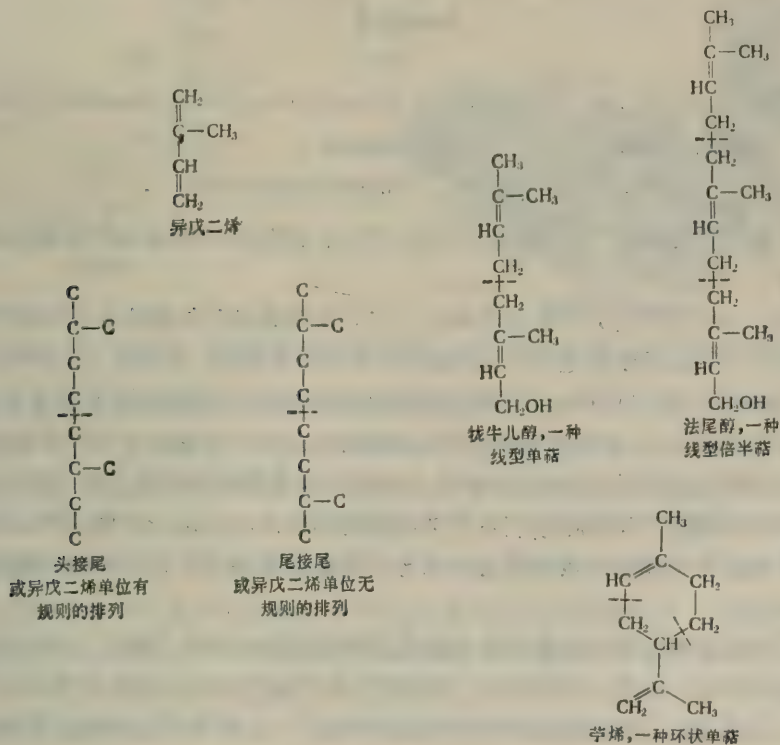


图 11-18 某些简单萜的结构中异戊二烯单位

植物中已鉴定的大量萜类,许多有特殊的气味或香气,是从这些植物衍生出的挥发油的主要成分。例如单萜类中牻牛儿醇、牻烯、薄荷醇、蒎烯、樟脑和黄蒿萜酮分别为老鹳草油、柠檬油、薄荷油、松节油、樟脑油和黄蒿子油的主要成分。法尼醇是倍半萜的一个例子。二萜类包括植醇,它是一种线型类萜醇,是光合色素叶绿素的一种组分。三萜类包括鲨烯,生物合成胆固醇的一个重要前身物。其它高级萜类包括类胡萝卜素,它是一类四萜烃及其含氧衍生物,其分子的中央异戊二烯单位由头到尾的排列特殊地反转过来(图 11-19)。 $\beta$ -胡萝卜素是一种重要的类胡萝卜素,它是维生素 A 的烃前身物。天然橡胶和杜仲胶都是多萜类;它们是由含有成百个异戊二烯单位有规则地线状排列的长链萜所构成。

在最重要的萜类中有三种脂溶性维生素,即维生素 A、E 和 K。虽然这些物质是哺乳

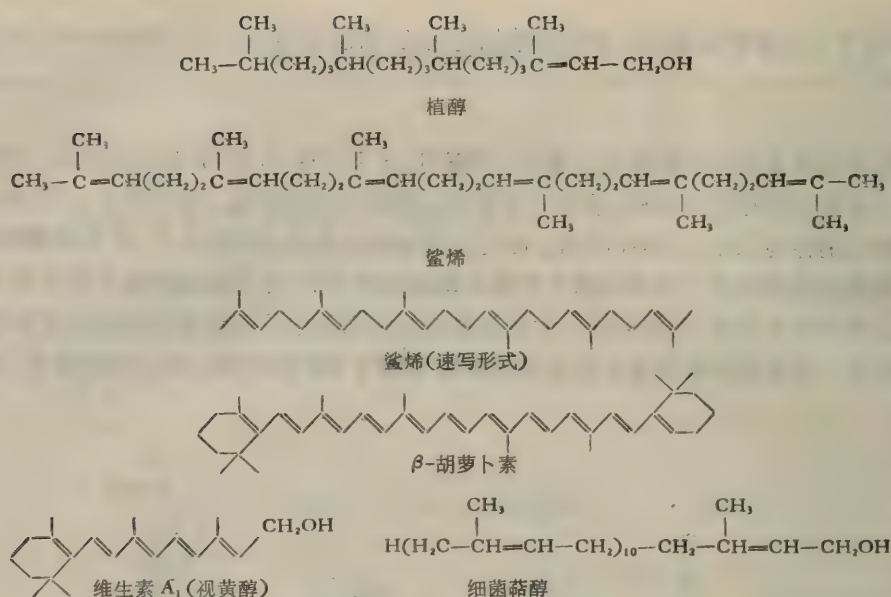


图 11-19 某些高级萜类。常用速写法标明萜的结构。

动物饮食中必需的微量物质,也可以列入脂类,但它们的生物功能是如此地突出,其结构和功能将在第十三章分别讨论。

以聚戊烯醇为代表的是另一类重要萜类,它们是末端具有伯醇基的长链线形聚类异戊二烯化合物。其中最重要的是十一异戊烯醇,也称细菌萜醇,它含有 11 个异戊二烯单位,故有 55 个碳原子(图 11-19)。多萜醇是动物组织中相应的类似物;它含有 19 个异戊二烯单位(95 个碳原子)。这些聚戊烯醇,其磷酸酯形式分别为磷酸十一异戊烯醇和磷酸多萜类,在合成细胞表面与细胞壁的脂多糖、肽聚糖、磷壁质酸和糖蛋白类过程中,从胞质的糖基酶促转移到细胞外表面时它们具有类似辅酶的作用。在这一过程中聚戊烯醇长的非极性烃链大概插到了膜的非极性核心内而分子的极性末端则在共价结合的糖基转运过膜时充当一只手臂。

还有另一类起辅酶作用的类萜化合物就是泛醌或辅酶 Q 族化合物,在线粒体内生物氧化中起氢载体作用。它们含有一个取代的醌环,它可以在还原以后后再氧化,还含有一条长的类异戊二烯侧链,其链长因各种生物而不相同。一种称为质体醌的类似物,存在于叶绿体,它们在光合作用中发挥作用。

## 类固醇

类固醇是饱和四环烃环戊烷多氢菲的衍生物(图 11-20)。从自然界分离出很多不同的类固醇,每种都有它特殊的功能或作用。由于类固醇的母体烃有六个不对称的中心,所以它们在双键数目和位置上,在取代功能基的类型、位置和数目上,在取代基与核之间键的构型( $\alpha$  或  $\beta$ ) 上,以及在相互关系中环的构型上均有所不同。取代的主要点为 A 环的 3 碳、C 环的 11 碳和 D 环的 17 碳。线状三萜鲨烯(图 11-19)极易环化,故所有类固醇都来源于它。这种环化作用的第一个重要类固醇产物就是羊毛固醇,在动物组织里它是胆固醇的前身物,而胆固醇又是动物组织里最丰富的类固醇。胆固醇和羊毛固醇均属类固



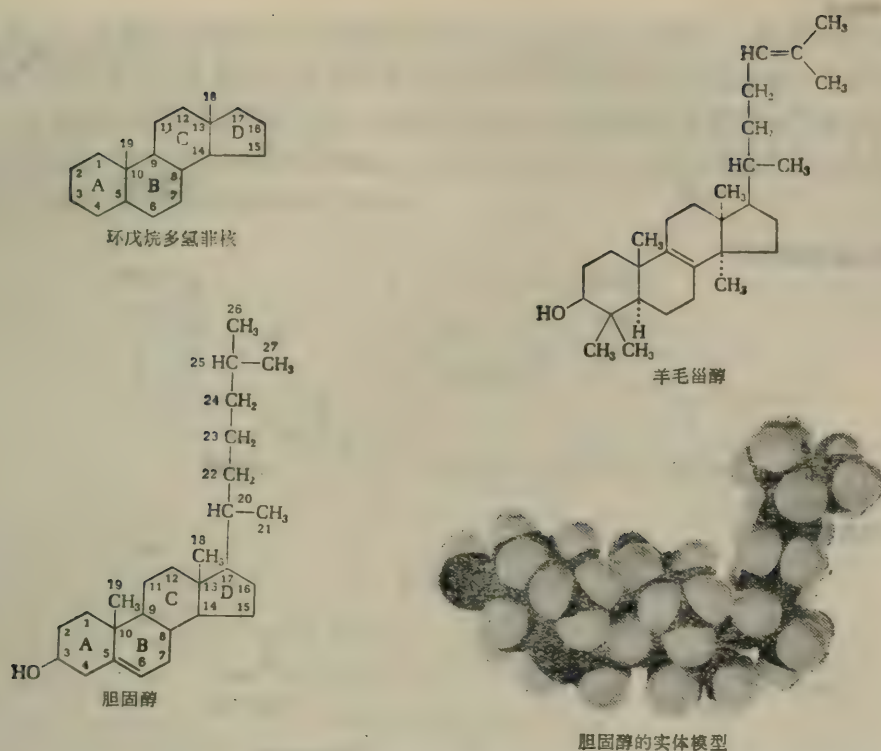


图 11-20 类固醇核，胆固醇与羊毛甾醇的结构。标明了类固醇环的名称以及碳原子数字。

醇的一大亚族，称为固醇类。它们是类固醇的醇类，在 A 环的 3 碳上含有一个羟基以及 17 碳上含有 8 个或更多碳原子的分支脂族链。它们以游离醇类或以 3 碳上羟基的长链脂肪酸酯形式存在；在室温下都是固体。胆固醇在 150℃ 时融化，且不溶于水，但用氯仿、乙醚、苯或热酒精易从组织中提取。胆固醇存在于许多动物细胞的质膜和血浆脂蛋白中。在确定羊毛甾醇（图 11-20）是动物组织中生物合成胆固醇的一个重要中间产物之前，首先在羊毛的蜡状外层中发现它的酯。高等植物里很少有胆固醇存在，它们含有其它种类的固醇统称为植物固醇，其中有豆固醇和谷固醇。真菌和酵母还含有其它种类的固醇，即菌固醇。其中麦角固醇，用日光照射时它能转化为维生素 D。细菌里没有固醇。

胆固醇是动物组织里许多其它类固醇的前身物，包括胆汁酸，即在肠内有助于脂类的乳化和吸收的类似去垢剂的化合物；雄激素或雄性激素；雌激素或雌性激素；妊娠激素孕酮；以及肾上腺皮质激素等（图 11-21）。某些类固醇激素的生物活性将在第二十九章讨论。在最重要的类固醇里有一组具有维生素 D 活性的化合物；它们的结构和功能将在第十三章讨论。

## 前 列 腺 素

前列腺素是一类具有激素性质或调节性质的各种强烈生物活性的脂肪酸衍生物。前列腺素这个名称首先是由瑞典生理学家 U. S. von Euler 在廿世纪三十年代给予从精液浆、前列腺以及储精囊发现的一种脂溶性酸性物质。这种物质极小量就能降低血压并刺激某

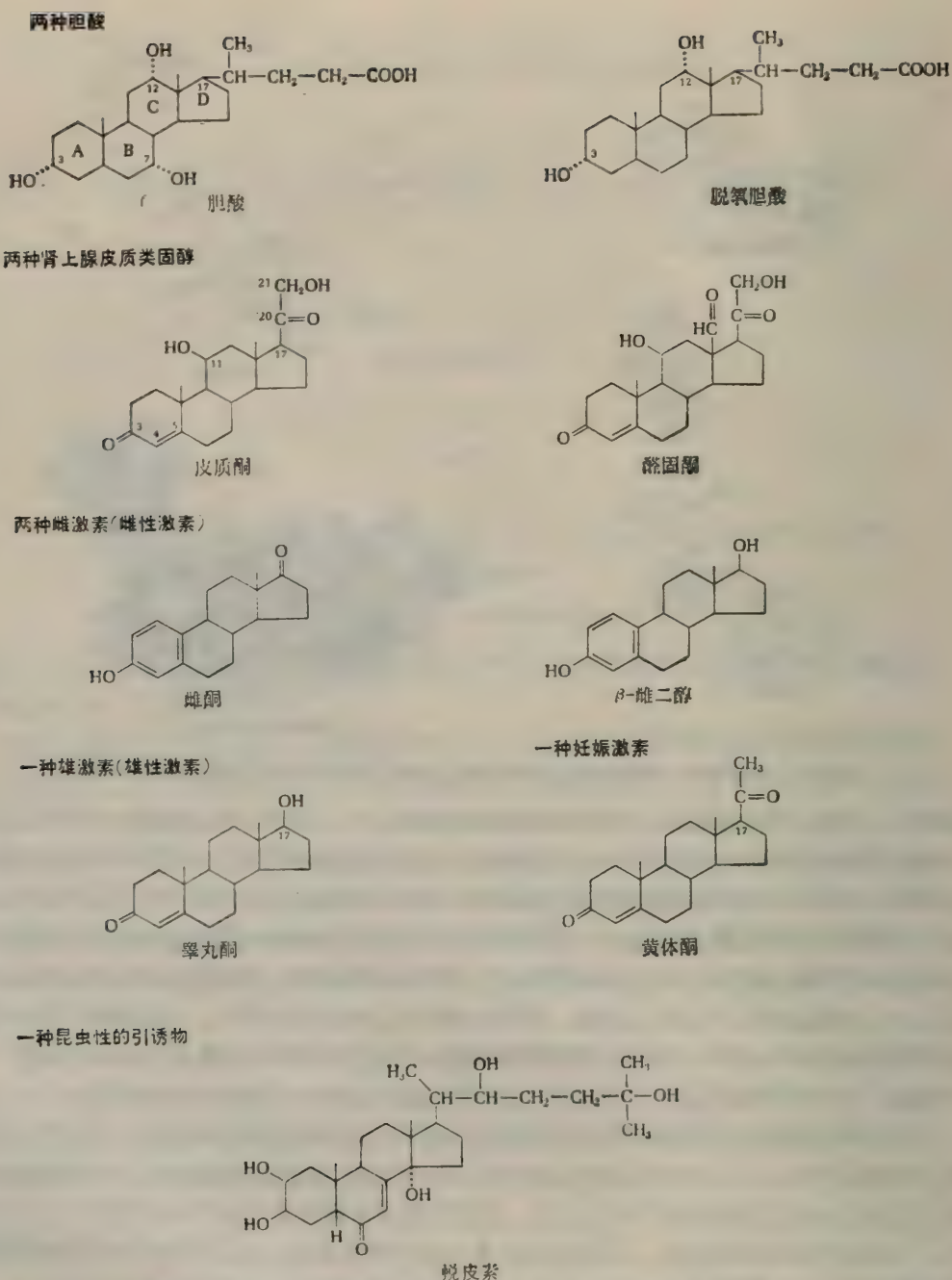


图 11-21 某些重要类固醇。两种胆酸常以甘氨酸和牛磺酸的酰胺出现。

些平滑肌收缩。最初以为前列腺素是特殊地由雄性生殖道所分泌的一种单纯物质。但近来的研究表明有许多种不同的前列腺素，它们在许多组织里以许多方式起着代谢调节物的作用。在人的精液浆里存在着至少 14 种前列腺素，而且在其它组织里发现的或在实验室人工合成的还有许多种。

前列腺素的结构是由瑞典的 S. Bergström 及其同事确定的。所有天然的前列腺素都



是由 20 碳不饱和脂肪酸如花生四烯酸在生物体内通过环化衍生出来的,后者又是由必需脂肪酸亚油酸形成的。脂肪酸骨架碳原子中的五个(碳 8—碳 12)绕成一个五碳环(图 11-22)。前列腺素是按它们环上取代基以及侧链上附加的顺式双键的数目来命名的。知道得最清楚的有前列腺素  $E_1$ ,  $F_{1\alpha}$  和  $F_{2\alpha}$ , 分别缩写为  $PGE_1$ ,  $PGF_{1\alpha}$  和  $PGF_{2\alpha}$ , 这些又是其它有生物活性的前列腺素的母体化合物。

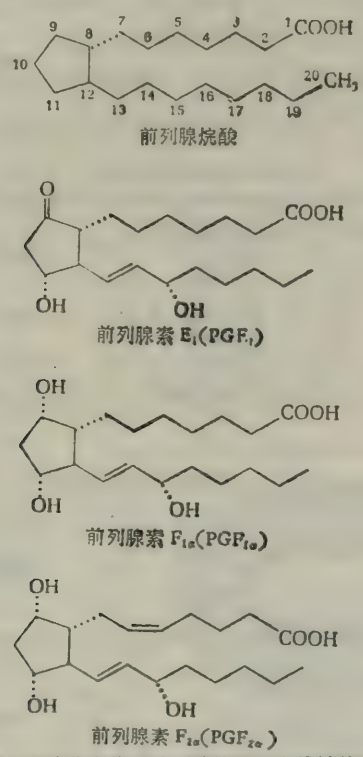


图 11-22 某些前列腺素、母体化合物为前列腺烷酸。点线键伸向书页平面的后方。

虽然所有的前列腺素至少都表现出使血压降低和诱发平滑肌收缩的作用,但就其生物活性而论是彼此不同的。有些前列腺素如  $PGE_1$  有对抗某些激素的作用。 $PGE_2$  和  $PGE_{2\alpha}$  在临床上可用来诱发分娩和引起治疗性流产。

### 脂质胶粒,单层与双层

将极性脂类像磷酸甘油酯加到水中,仅一小部分溶解以形成真分子溶液。超过临界胶粒浓度时极性脂类便加入各种类型的聚合体,它们与肥皂形成的胶粒类似。在这种结构中(图 11-23)烃尾背离有水环境隐藏起来并形成一个内在的疏水相,而亲水的头部则皆暴露于表面。三酰基甘油并不形成这种聚合体,因为它们没有极性头部。

磷酸甘油酯既在空气-水的界面上形成单层又形成双层以分离两个含水隔室。脂质体(图 11-23)是当磷酸甘油酯-水的悬浮液暴露在音波震动下形成的一种完全密闭的囊状双层结构。这种双层系统曾作为天然膜的模型而被广泛地研究过,这类天然膜似乎含有极性磷脂双层作为其连续相。

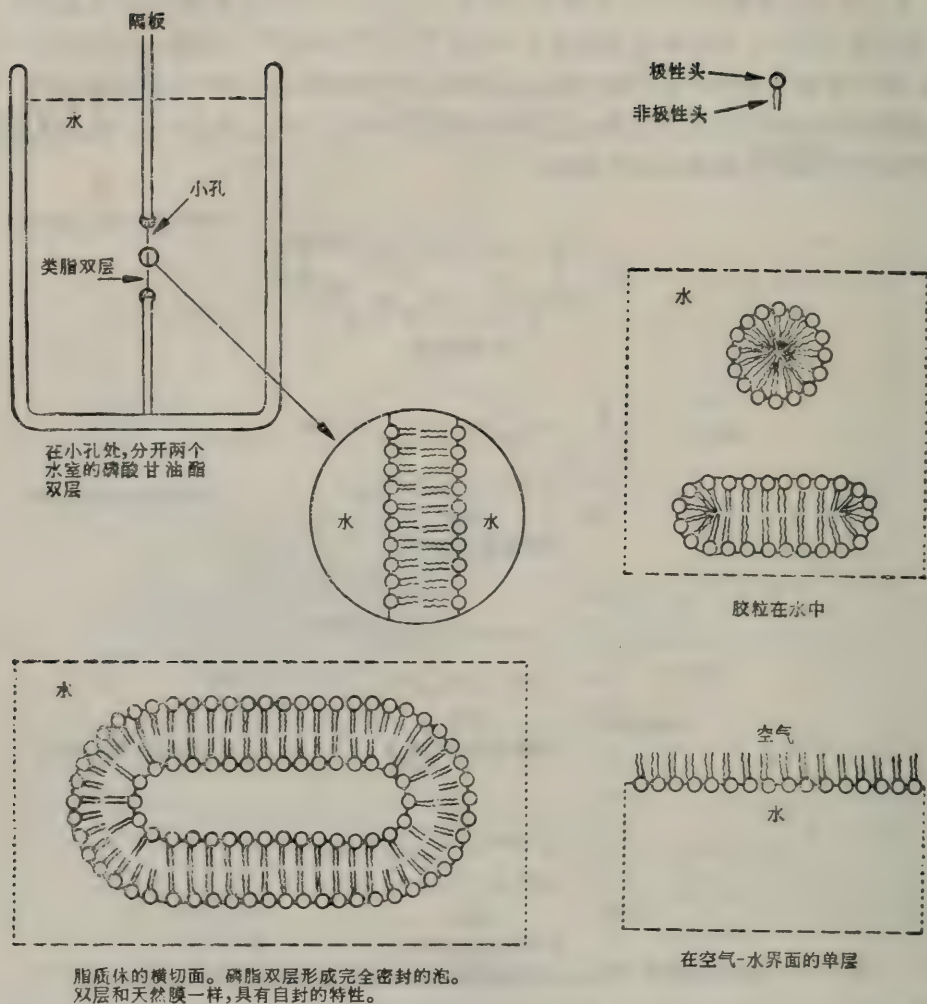


图 11-23 安定的磷酸甘油酯-水体系

## 脂 蛋 白 系 统

某些脂类与特异蛋白质结合形成脂蛋白系统, 在其中两类生物分子的特殊物理性质混合起来。脂蛋白有运输脂蛋白和膜系统两种主要类别。在这些系统里脂类与蛋白质不是共价结合, 而主要是通过脂类和蛋白质成分中的非极性部分之间的疏水性相互作用结合在一起。

## 血浆的运输脂蛋白类

血浆脂蛋白是脂类与蛋白质以相对固定的比率而存在的络合物。它们以一种较小而粒子直径和重量固定的形式, 经由血液在各器官之间运载不溶于水的脂类。人类血浆脂蛋白有四种主要类型, 其比重及粒子大小均不相同。(表 11-8) 在超速离心的高引力场下它



们的相对浮率不同,可以在物理上将它们区分开来。所有四种脂蛋白的密度都在 1.21 克/毫升以下,而其它血浆蛋白如清蛋白和  $\gamma$ -球蛋白的密度则在 1.33 到 1.35 克/毫升范围内。脂蛋白的特殊浮率的 Svedberg 浮力单位 ( $S_f$  计) 是在 26℃ 下在密度为 1.063 克/毫升的 NaCl 介质中测定的,在此介质中脂蛋白向上浮而单纯蛋白质则下沉。

表11-8中所示血浆脂蛋白含有不同比例的蛋白质和不同类型的脂类。极低密度脂蛋白含有四种不同类型的多肽链其氨基酸顺序各不相同。高密度脂蛋白含有两种不同类型的多肽链,分子量约为 150,000。血浆脂蛋白的多肽链可能排列在分子的表面,因而具有亲水性质。然而在极低密度脂蛋白和乳糜微粒中,没有足量的蛋白质能覆盖表面,大概磷脂组分的极性头也在表面上提供亲水基,而非极性的三酰基甘油则在内部。

表 11-8 人类血浆脂蛋白的主要类别

	乳糜微粒	极低密度脂蛋白 (VLDL)	低密度脂蛋白 (LDL)	高密度脂蛋白 (HDL)
密度,克/毫升	<0.94	0.94—1.006	1.006—1.063	1.063—1.21
浮率, $S_f$	>400	20—400	0—20	(沉淀)
粒子大小,毫微米	75—1,000	30—50	20—22	7.5—10
蛋白质,干重%数	1—2	10	25	45—55
三酰基甘油,干重%数	80—95	55—65	10	3
磷脂,干重%数	3—6	15—20	22	30
胆固醇游离的干重%数	1—3	10	8	3
胆固醇酯化的,干重%数	2—4	5	37	15

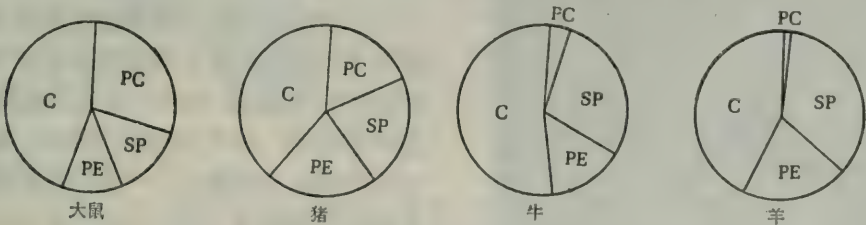


图 11-24 不同哺乳类动物红细胞膜的脂类成分。注意胆固醇与磷脂酰乙醇胺的比例大致恒定,但由于种族不同磷脂酰胆碱与鞘磷脂的比率变化很大。

注解: C=胆固醇 PE=磷脂酰乙醇胺 PC=磷脂酰胆碱 SP=鞘磷脂

膜

膜是细胞结构的一个显著特征,在某些真核细胞里不同的膜系统可以构成细胞总干重的 80 %。膜不仅可以用作分离有不同溶质成分的含水隔室的墙,而且也用作某些酶类与运输系统牢固结合的结构基础。它们很薄(约 8 毫微米)而且是柔韧的。

膜的组分

大多数膜约含有 40 % 的脂类和 60 % 蛋白质,但差异颇大。一个极端是线粒体内膜

仅含脂类约20—25%，而另一个极端则是包着某些神经的髓鞘膜可能含脂类达75%。膜中脂类大部分是极性的；磷酸甘油酯占优势，还有很少量的鞘脂类。事实上，几乎细胞的所有极性脂类都集中在它们的膜上。内质网和细胞器膜所含胆固醇或三酰基甘油较少，而高等动物某些细胞的质膜则含有大量游离的和酯化的胆固醇。膜中各种极性脂类的比率是膜系统类型、器官和种属的特性。例如图11-24表明不同种类的动物的红细胞质膜中主要脂类的分布情况。在一种膜中不同脂类的克分子比率似乎是由遗传决定的，不能改变，例如，不能以不同脂类的混合物饲养脊椎动物来改变。然而个别脂类的脂酸组分并非固定的，而是随营养状况和环境温度而改变。在任何一定种类的细胞内，不同类型的膜的脂类成分不一定相同；如大鼠肝细胞的质膜、线粒体膜与内质网膜的脂类成分差别很大。

每一类型的膜含有几种或很多种蛋白质或多肽。膜蛋白可分为两类。外在的或周边的蛋白质，仅与膜表面疏松地接触并且可容易地用温和的提取方法使成为溶解形式而被移除。内在的或完整的蛋白质构成膜蛋白质总量的70%或更多，与脂类部分紧密结合，并且只能用剧烈的处理方法移除。内在蛋白质在中性水溶系统里是高度不溶的，但可以用去垢剂如十二烷基硫酸钠，或用散开剂如6M的盐酸胍提取。当用后一种试剂提取红细胞膜时，就得到17种不同的多肽链，分子量为27,000—220,000。其中有血型糖蛋白，它是一种完全伸展开来横过膜的糖蛋白。线粒体内膜是最复杂的膜之一，它可能含有100种以上不同的多肽链。

曾用各种物理方法以确定膜结构中脂类分子和蛋白质分子的排列。用电子显微镜已经证明膜有一种三层结构（图11-25），随着膜的类型不同其总厚度为7.0—9.0毫微米。



图11-25 红细胞质膜的高倍电子显微镜照片。用四氧化锇固定后显示出三层的影象，通常两条电子致密线分开一个约2.5毫微米的清晰空间。

用旋光色散法和圆二色性测量法表明膜中蛋白分子具有较高的右旋 $\alpha$ 螺旋的含量。膜的脂类分子似乎排列成双层结构。这不仅是因为天然膜的高电阻力表明连续烃相的存在，而且用自旋标记技术做的实验也证明如此。在这个首先由H. McConnell及其同事建立的灵巧方法中，带有自旋标记物的一种脂肪酸或脂类被结合到膜内。一种广泛应用的自旋标记物为硝酰基（图11-26），其N—O键含有一个不成对的电子，它的自旋的特殊方向与脂肪酸链长轴有关。电子自旋共振分光法(ESR)，亦称电子顺磁共振分光法(EPR)，可测出不成对电子自旋所产生的顺磁性，用此法可确定自旋标记的脂肪酸或脂类在双层或膜内的方向性定位和运动。用这一方法已经证明磷脂在天然膜内能在膜的平面内自由移动，但不易从一边横渡到另一边。而且沿脂肪酸分子的烃链将自旋标记物放到不同距离上，发现链的非极性末端容易摇摆，而接近

羧基的一端则比较固定，几乎与膜的平面垂直。



膜结构

1935年 H. Davson 和 J. Danielli 提出生物膜结构的第一个重要假说。其假说的一个重要特点即提出了膜含有一个由膜的脂类组分提供的连续烃相。若干年以后这个假说又由 J. D. Robertson 修订并精炼成为单位膜假说。提出单位膜是由混合极性脂类双层所组成,其烃链定向朝内以形成连续的烃相,而其亲水头部则定向朝外。推想每一表面包上一单分子层的蛋白质分子,而多肽链则呈伸展形式。提出单位膜的总厚度约为 8—9 毫微米,脂类双层的厚度约为 6—7 毫微米。后来其他研究者提出球状或亚基模型,在此模型中膜被认为是由一张张直径为 4.0—9.0 毫微米的重复出现的脂蛋白亚基所组成,与某些低聚蛋白质的亚基结构或某些病毒外壳相类似。然而球状模型不能满意地解释膜的许多性质。

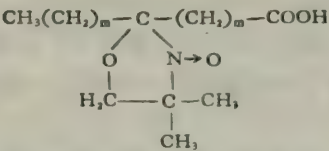


图 11-26 带硝酰基作为自旋标记的一个脂肪酸

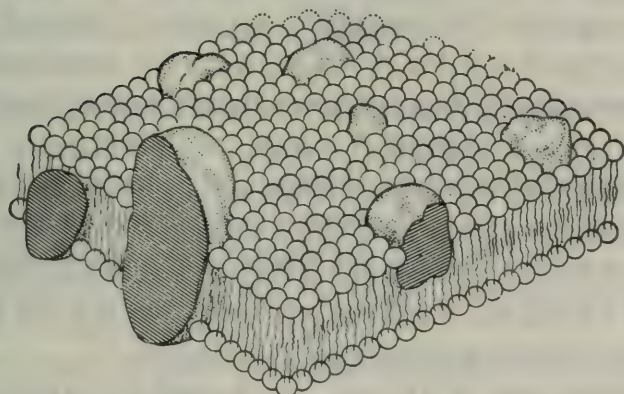


图 11-27 膜结构的流动镶嵌模型。膜是由流动磷脂双层所组成的,并具有球状蛋白分子穿入膜的任一边或完全伸展过膜,蛋白质分子排列没有长距离规律,但有些可能组成复合物。膜可能是不对称的。真核细胞的质膜的外表面有低聚多糖链从糖脂与糖蛋白中突出。(见图 10—36)

目前膜结构最满意的模型看来是 S. J. Singer 和 G. L. Nicolson 1972 年提出的流动镶嵌模型。这个模型(图 11-27)假设膜的磷脂成双层排列形成流体,液态晶形的基质或核心。在这一双层中个别脂类分子可以向侧面移行,赋予双层以流动性、柔韧性以及特有的高电阻和对高极性分子的相对不可透性。流动镶嵌模型假定膜蛋白质是球状的,以说明其  $\alpha$  螺旋的高含量。有些蛋白质部分地嵌入膜中,从两边伸入脂相,而其它蛋白质则完全埋在膜中。一定球状蛋白穿进脂相中达到什么程度将决定于蛋白质的氨基酸顺序以及氨基酸非极性 R 基在膜表面的位置。因此各种膜蛋白将在其它流动的磷脂双层里形成一种镶嵌似的结构。这种镶嵌不是固定的或静止的,因为至少在某些膜里蛋白质可自由地朝侧面作两度空间扩散,认为脂类双层的相对粘度是水粘度的 100—1000 倍。

流动镶嵌模型能满意地解释生物膜的许多特征和性质。此模型给膜提供蛋白质含量差异很大,这决定于膜的每一单位面积内不同蛋白质分子的个数;它为不同类型的膜提供各种厚度;由于它允许不同类型的蛋白质排列在脂类双层的两个表面上,因而它能解释天然膜的不对称性;它能解释膜的电性质和通透性;也能解释这一现象即细胞膜的某些蛋白质组分能以较高的速度在膜的平面上移动。

大多数膜似乎是不对称的,每一表面上具有不同类型和(或)不同数目的特殊蛋白质。特别是真核细胞的质膜常有一层由膜糖蛋白的亲水低聚糖侧链与膜糖脂的低聚糖头基所构成的外壳或糖萼。

## 摘 要

脂类是能够用非极性溶剂提取的不溶于水的细胞组分。复杂的或可以皂化的脂类含有脂肪酸,通常为偶数碳原子,链长 12—22 个碳原子。不饱和脂肪酸的双键通常是顺式构型。大多数不饱和脂肪酸在 9, 10 位置上有一个双键。脂肪酸可以用气-液分配层析分离和分析。

三酰基甘油(甘油三酯)含有三个脂肪酸分子与甘油的三个羟基酯化。三酰基甘油在细胞里主要是以脂肪小滴的形式储存燃料。磷酸甘油酯含有二个脂肪酸分子与 3-磷酸甘油的两个游离羟基酯化和一个醇与磷酸酯化。它们的极性头基的极性与电荷不同。它们主要存在于膜内。鞘脂类不含甘油,但有两个长烃链,一个由脂酸提供,另一个由一个长链脂肪族氨醇即鞘氨醇提供。鞘磷脂是唯一含有磷酸的鞘脂类。中性糖鞘脂类含有糖头基;最简单的脑苷脂类含 D-葡萄糖或 D-半乳糖。神经节苷脂是含有一个或更多个 N-乙酰神经氨酸的酸性糖鞘脂;它们是细胞表面的重要成分。蜡是高分子量醇的脂酸酯。

简单的或非皂化的脂类包括萜类和类固醇。萜类是由两个或更多个异戊二烯单位所组成的线形或环状化合物。类固醇是从萜类鲨烯衍生的。固醇类是类固醇的醇类;胆固醇是动物组织里最丰富的固醇。其它类固醇包括性激素,肾上腺皮质激素和胆汁酸。20-碳不饱和脂肪酸的环状衍生物前列腺素在生物调节中起作用。

极性脂类自发地形成胶粒、单层和双层。在血液中脂类是以血浆脂蛋白运输的,它们有四种密度不同的类别。

大多数膜含有约 50—60% 蛋白质和 40—50% 脂类。脂类以固定克分子比率存在,这可能是由遗传决定的。设想了膜结构的几种模型。许多证据支持流动镶嵌模型,它由一种液态晶形磷酸甘油脂双层构成球状蛋白部分地或完全插入其中。有些质膜蛋白质含有低聚糖侧链,它们从细胞表面突出。

## 参 考 文 献

### 书籍

- Ansell, G. B. J. N. Hawthorne, and R. M. C. Dawson: *Form and Function of Phospholipids*, 2d ed., Elsevier, London, 1973. Up-to-date, comprehensive treatise covering all aspects of phospholipid biochemistry.
- Chapman, D.: *The Structure of Lipids by Spectroscopy and X-Ray Techniques*, Methuen, London, 1965. The physicochemical aspects of lipids and membranes.



*CRC Handbook of Chromatography*. Chemical Rubber Co., Cleveland, 1972. Detailed methods and data on lipid chromatography.

Gurr, M. I., and A. T. James: *Lipid Biochemistry: An Introduction*, Cornell University Press, Ithaca, N.Y., 1971. A short, excellent introduction.

Heftmann, E.: *Steroid Biochemistry*, Academic, New York, 1969.

Horton, E. W.: *Prostaglandins*, vol. 7, Monographs on Endocrinology. Springer-Verlag, New York, 1971. A recent treatise on all aspects of prostaglandin research.

Rothfield, L. I. (ed.): *Structure and Function of Biological Membranes*, Academic, New York, 1971. A collection of papers dealing with the biochemical aspects of membranes.

## 论文

Bergström, S., and B. Samuelsson: "The Prostaglandins," *Endeavour*, 27: 109—113 (1968). An excellent brief summary.

Bretscher, M. S.: "Membrane Structure: Some General Principles," *Science*, 181: 622—629 (1973).

Coleman, R.: "Membrane-Bound Enzymes and Membrane Ultrastructure," *Biochim. Biophys. Acta*, 300: 1—30 (1973).

Iupac-Iub Commission of Biochemical Nomenclature: "The Nomenclature of Lipids," *Biochem. J.*, 105: 897—902 (1967).

Singer, S. J., and G. L. Nicolson: "The Fluid Mosaic Model of the Structure of Membranes," *Science*, 175: 720—731 (1972).

Stoeckenius, W., and D. M. Engelman: "Current Models for the Structure of Biological Membranes," *J. Cell Biol.*, 42: 613—646 (1967). An excellent review of the unit membrane and globular (subunit) models.

Van Deenen, L. L. M.: "Phospholipids and Biomembranes," *Prog. Chem. Fats Lipids*, 8: 1—127 (1966). Comprehensive review of the chemical relationship of phospholipids to membrane structure.

## 习题

1. 标明一个含有棕榈酸,硬脂酸与油酸的三酰基甘油的所有可能异构体的结构。包括位置异构体与立体异构体。

2. 三酰基甘油的一个混合物水解时生成油酸(O),棕榈酸(P)和硬脂酸(S)。

(a) 标明原混合物中所有可能的分子种类的结构

(b) 倘若只有L-型立体异构体存在于混合物中,将有多少种存在?

3. 从一个鳄梨提出一个甘油三酯的样品(5克)需要0.5 MKOH 36.0毫升才能完全水解并将其脂肪酸转变成肥皂。试计算样品中脂肪酸的平均链长。

4. 1-棕榈酰-2-硬脂酰-3-月桂酰甘油与磷脂酸的混合物在苯中与等体积的水震荡,让两相分开后,问那种脂类在水相中的浓度较高?为什么?

5. 一个含有(a)心磷脂,(b)磷脂酰甘油,(c)磷脂酰乙醇胺,(d)磷脂酰丝氨酸,和(e)O-赖氨酰磷脂酰甘油的脂类混合物在pH 7.0时进行电泳。指出你将如何推测这些化合物的移动:向阳极(A),向阴极(C),或停在原处(O)。

6. 命名用稀NaOH水解下列各物的产物:(a)1-硬脂酰-2,3-二棕榈酰甘油,(b)1-硬脂酰-2-反油酰磷脂酰肌醇,(c)1-棕榈酰-2-油酰磷脂酰胆碱。

7. 命名下列产物:(a)用强碱然后再用酸水解1-棕榈酰-2-油酰磷脂酰丝氨酸,(b)用磷脂酶D处理1-棕榈酰-2-亚油酰磷脂酰胆碱。

8. 大多数动物细胞膜按重量含有60%的蛋白质和40%的磷酸甘油酯。(a)假定蛋白质的密度为1.33克/厘米<sup>3</sup>而磷酸甘油酯密度为0.92克/厘米<sup>3</sup>,试计算膜的平均密度。(b)若将一个膜物质的样品放在密度为1.05克/厘米<sup>3</sup>的NaCl溶液中离析,它将下沉还是上浮?

9. 若是一种膜按重量计含60%蛋白质和40%磷酸甘油酯,试计算磷酸甘油酯与蛋白质的克分子比率。假定脂类分子的平均分子量为800而蛋白质的平均分子量为50,000。

[任邦哲译 唐恢玲校]

## 第十二章 核苷酸和核酸的共价结构

脱氧核糖核酸(DNA)和核糖核酸(RNA)是链状的大分子,它们具有贮存和传递遗传信息的功能,是所有细胞的重要成分,占细胞干重的5—15%。病毒——在特殊的宿主细胞中具有直接进行自我复制能力的传染性核酸-蛋白质复合物——中也具有核酸。虽然核酸是因为DNA首先从细胞核分离出来的而得名,但是DNA和RNA也存在于细胞的其它部分。

正如氨基酸是多肽的结构单位或单体单位一样,核苷酸是核酸的单体单位。蛋白质和核酸之间还有更进一步的类似之处。正如用蛋白质特征性的侧链顺序或氨基酸单体的R基团顺序来区别一种与另一种类型蛋白质一样,每一类型的核酸也可用核苷酸单体的特征性杂环碱基顺序来区别。

本章中我们首先讨论核苷酸的结构和性质,核苷酸不仅是核酸的结构单位,而且在中间代谢中也有重要作用。然后我们将讨论DNA和RNA的共价主链结构和核酸中核苷酸单位顺序的推导问题。最后,我们将讨论某些含有核酸的超分子和颗粒的结构,特别是核糖体和病毒。核酸的立体结构以及它在贮存及传递遗传信息的生物学功能,将在本书的第四部分再进一步讨论。

### 核苷酸的一般结构

DNA的单体单位称为脱氧核糖核苷酸, RNA的单体单位是核糖核苷酸。每种核苷酸含有三个特有的成分:(1)一个含氮杂环碱基,它们是嘧啶或嘌呤的一种衍生物;(2)一个戊糖;(3)一个分子磷酸。主要的核苷酸见12-1图。

四种不同的脱氧核糖核苷酸是DNA的主要成分(图12-1),它们彼此的区别只是含氮碱基成分不同(含氮碱基的名称下面再讲)。DNA的脱氧核糖核苷酸的四种特有碱基是嘌呤的衍生物——腺嘌呤和鸟嘌呤,及嘧啶的衍生物——胞嘧啶和胸腺嘧啶(图12-2)。与此相似,四种不同的核糖核苷酸是RNA的主要成分(图12-1)。它们含的嘌呤碱基是腺嘌呤和鸟嘌呤,而嘧啶碱基是胞嘧啶和尿嘧啶(图12-2)。于是胸腺嘧啶(5-甲基尿嘧啶)是DNA特有的,而RNA中通常不存在。然而尿嘧啶通常是存在于RNA中,DNA中罕见。

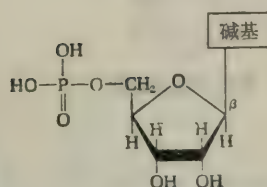
这两类核酸在组成上的其它区别为:脱氧核糖核苷酸以2-脱氧-D-核糖为其戊糖组分,而核糖核苷酸则含D-核糖。在核苷酸中两种糖都是以它们的呋喃糖形式存在的。这些糖和其它糖的化学和物理性质已在第十章中讨论了。戊糖与碱基是通过戊糖的第1碳原子与嘌呤碱基的第9氮原子或嘧啶碱基的第1氮原子之间的一个 $\beta$ -N糖苷键连接起来的。核苷酸的磷酸根与戊糖的第5碳原子形成酯键。

当核苷酸的磷酸根被水解去掉后,残余的结构就称为核苷。因此各种核苷酸就是相应的5'-磷酸核苷类(图12-1)。下面我们将知道细胞也含有各种常见核苷的5'-二磷酸



5'-磷酸核糖核苷

5'-磷酸 2'-脱氧核糖核苷



一般结构

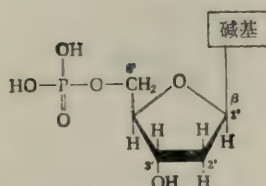
名 称

5'-磷酸腺苷(腺苷酸; AMP)

5'-磷酸鸟苷(鸟苷酸; GMP)

5'-磷酸胞苷(胞苷酸; CMP)

5'-磷酸尿苷(尿苷酸; UMP)



一般结构

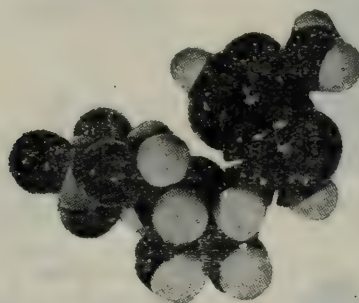
名 称

5'-磷酸脱氧腺苷(脱氧腺苷酸; dAMP)

5'-磷酸脱氧鸟苷(脱氧鸟苷酸; dGMP)

5'-磷酸脱氧胞苷(脱氧胞苷酸; dCMP)

5'-磷酸脱氧胸苷(脱氧胸苷酸; dTMP)



腺苷(阴离子形式)的实体模型

图 12-1 主要的核糖核苷酸和脱氧核糖核苷酸

酯类和 5'-三磷酸酯类,故核苷酸的缩写里M表示单个。(图 12-1)

现在我们将含氮碱基着手较细致地研究核苷酸各成分的性质。因为是它们给予了 DNA 和 RNA 的单体核苷酸单位以化学个性。

## 嘧啶类和嘌呤类

在核苷酸里发现的两类含氮碱基的母体化合物是杂环化合物嘧啶和嘌呤(图 12-2),它们具有很明显的芳香族特性。嘌呤本身可以认为是嘧啶的一种衍生物,它是由一个嘧啶环和一个咪唑环稠合在一起组成的。三种嘧啶的衍生物为尿嘧啶、胸腺嘧啶和胞嘧啶,两种嘌呤的衍生物为腺嘌呤和鸟嘌呤,它们构成核苷酸中存在的主要含氮碱基(图 12-2)。在大多数细胞中,这些碱基只有少数是呈游离或不结合形式存在,而它们通常是酶水解核酸和核苷酸的产物。

各种嘧啶和嘌呤的确切主体结构,已用 X 射线衍射分析法推断出来了。嘧啶是平面分子;嘌呤很近似于平面,而有轻微折叠。腺嘌呤的确切大小尺寸见图 12-3,嘌呤和嘧啶的实体模型见图 12-2。不仅碱基的大小而且它们产生氢键的能力都决定着核酸的生物学功能(第三十一章)。与氢键形成有关的重要功能基团有腺嘌呤、鸟嘌呤和胞嘧啶的氨基,腺嘌呤和鸟嘌呤第 1 位置和胞嘧啶碱基第 3 位置上的环-NH-基团,以及嘧啶的第 2 位置和鸟嘌呤的第 6 位置上的强负电性的氧原子。(图 12-2)

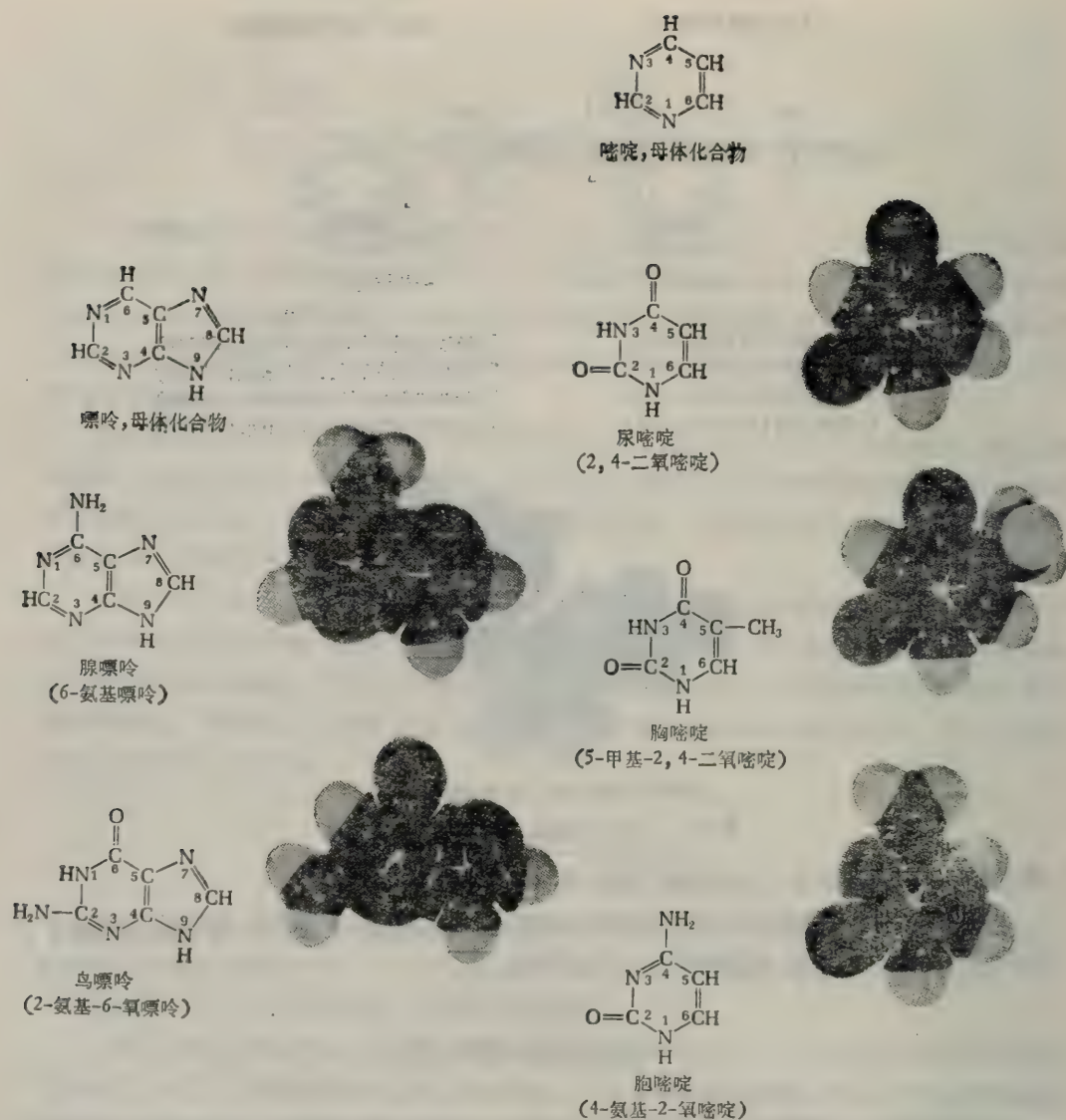


图 12-2 常见的嘌呤和嘧啶碱基的结构和实体模型

游离嘧啶和嘌呤碱基在水中是相对难溶解的,它们是弱碱化合物,随 pH 不同能以两种或多种互变异构的形式存在。例如尿嘧啶就有内酰胺和内酰亚胺的形式(图 12-4)。在 pH 7.0 时,尿嘧啶内酰胺形式占优势。图 12-2 中所示的其它嘌呤和嘧啶的结构,是在 pH 7.0 时占优势的互变异构形式。这些也是在天然 DNA 分子中看到的与碱基之间氢键有关的形式,我们将在以后知道。(第三十一章)

除了以上所列举的常见碱基外,还有许多其它的嘌呤和嘧啶衍生物,称为罕见的或次要的碱基。在某些核酸中少量出现,罕见的嘧啶中有 5'-甲基胞嘧啶和 5-羟甲基胞嘧啶;次要的嘌呤包括 6-甲基腺嘌呤和 2-甲基鸟嘌呤(图 12-5)。这些及其它次要的碱基已列入表 12-1 中。它们大多数是主要碱基的甲基衍生物。但是某些含有乙酰基、异戊烯基或羟甲基。罕见的碱基在转移 RNA 中特别突出,这些异常的成分含量可达 10%。在 tRNA



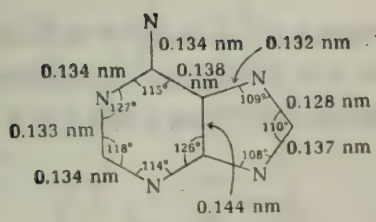


图 12-3 腺嘌呤分子的大小尺寸

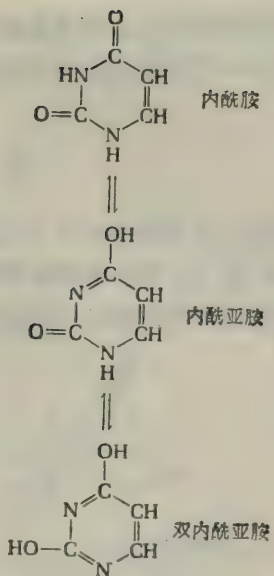
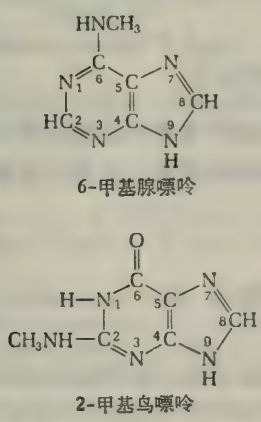


图 12-4 尿嘧啶的互变异构式

两种次要的嘌呤



两种次要的嘧啶

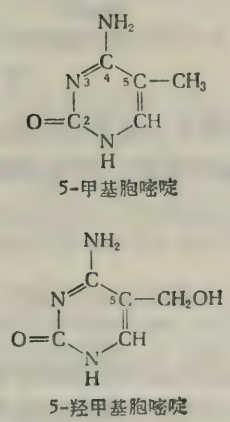


图 12-5 某些罕见的碱基

表 12-1 在核酸中发现的其它罕见的碱基

5,6-二羟尿嘧啶	1-甲基腺嘌呤
1-甲基尿嘧啶	2-甲基腺嘌呤
3-甲基尿嘧啶	7-甲基腺嘌呤
5-羟甲基尿嘧啶	N <sup>6</sup> -甲基腺嘌呤
2-硫尿嘧啶	N <sup>6</sup> , N <sup>6</sup> -二甲基腺嘌呤
N <sup>4</sup> -乙酰基胞嘧啶	N <sup>6</sup> -(Δ <sup>1</sup> -异戊烯基)腺嘌呤
3-甲基胞嘧啶	1-甲基鸟嘌呤
5-甲基胞嘧啶	7-甲基鸟嘌呤
5-羟甲基胞嘧啶	N <sup>2</sup> -甲基鸟嘌呤
	N <sup>2</sup> , N <sup>1</sup> -二甲基鸟嘌呤

中已发现的罕见碱基在 30 种以上。  
 在波长 250—280 毫微米区域内，核酸的所有嘌呤和嘧啶碱基都强烈地吸收紫外光。

这一性质不仅在游离碱基，而且在核苷和核苷酸的检定和定量分析中很有用处。游离嘌呤和嘧啶碱基容易用层析或电泳法分离。

## 核 苷 类

核苷有两类：所含糖组分为 D-核糖的核糖核苷类以及含有 2-脱氧-D-核糖的脱氧核糖核苷类(图 12-6)。同游离嘌呤和嘧啶一样，在大多数细胞中只存在微量的游离核苷，它们是核苷酸的化学的或酶的水解产物。核苷比相应的游离碱基更容易溶于水。它们用

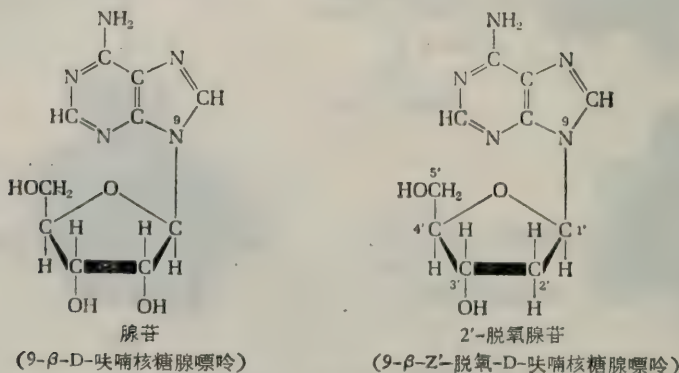


图 12-6 腺嘌呤核苷

层析法容易分离和鉴定。象糖苷一样，核苷在碱溶液中较稳定。嘌呤核苷类颇容易被酸水解，产生游离碱基和戊糖。然而，嘧啶核苷能抗酸水解。这两类核苷都可用具有特异性的核酸酶水解。

## 核 苷 酸 类

细胞内有相当量的核糖核苷酸和脱氧核糖核苷酸以游离形式存在。它们的磷酸根是较强的酸，在 pH 7.0 时游离的核苷酸主要是以  $N-O-PO_3^-$  的形式存在(N 是核苷基团)。由于有嘧啶或嘌呤碱基存在，所有的核苷酸在波长 250 到 280 毫微米区域内都显示对紫外光的强烈吸收。这一点在定量分析上很有用。图 12-7 示出了某些核苷酸特有的紫外光谱。核苷酸用离子交换层析法容易进行分离和定量分析。

核苷和核苷酸含有两个近似平面的碱基环和呋喃核糖环。在大多数结构稳定的核苷酸中，这种环不是共平面的，而是几乎彼此垂直。呋喃核糖环的 2' 氢或羟基放在很接近嘌呤第 3 氮原子或嘧啶的第 2 氧原子的地方。我们将在下面讲到，在完整的核酸分子中，也存在这种核苷酸的构象。(第三十一章)

### 5'-二磷酸核苷类和 5'-三磷酸核苷类

细胞中所有常见的核糖核苷和脱氧核糖核苷，不只是如同上述以 5'-一磷酸酯类存在，也以 5'-二磷酸酯类和 5'-三磷酸酯类存在，也就是核苷的 5'-焦磷酸酯类和 5'-三磷酸酯类(图 12-8)。因此，有三类 5'-磷酸核苷类，例如腺苷的 5'-磷酸酯类，有 5'-一磷酸腺苷



(AMP), 5'-二磷酸腺苷 (ADP) 和 5'-三磷酸腺苷 (ATP)。这些化合物的磷酸残基用  $\alpha$ ,  $\beta$  和  $\gamma$  符号来表示。(图 12-8)

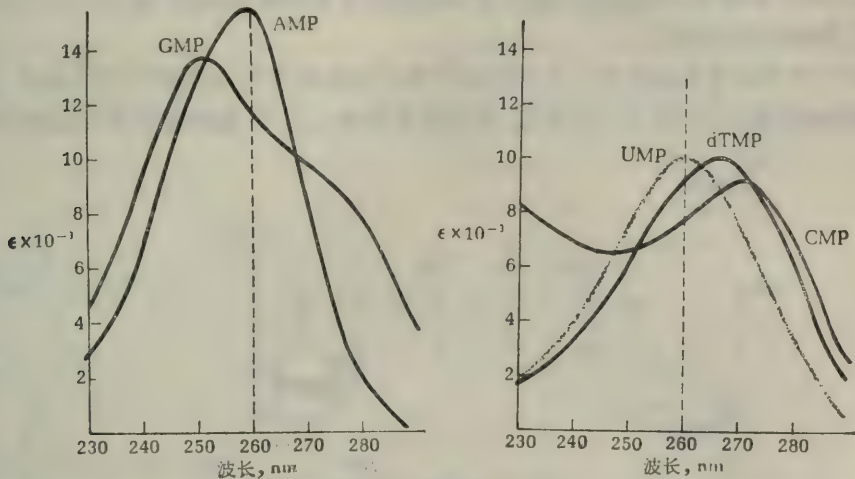


图 12-7 Lambert-Beer 定律,常见核苷酸的吸收光谱和它们在 260 毫微米区域的克分子吸收系数。

光吸收的测定,是核苷酸和核酸分析的一种重要工具。入射光被一种溶液在已知波长所吸收的部分,与吸收层的厚度和吸光物质的浓度有关。这两种关系可以合并成 Lambert-Beer 定律,并以其积分式表示为:

$$\log \frac{I_0}{I} = \epsilon Cl$$

上式中  $I_0$  是入射光的强度,  $I$  是透过光的强度,  $\epsilon$  是克分子吸收系数(每克分子-厘米-升单位)。  $C$  是每升中吸光物质的克分子浓度,  $l$  是吸光样品的厚度(厘米)。 Lambert-Beer 定律假定入射光是平行的单色光, 而且溶剂和溶质分子是任意定向的。上式  $\log \frac{I_0}{I}$  被称为吸收率,命名  $A$ 。

应该注意,在一个 1.0 厘米厚的比色杯中,每 1 毫米厚的吸光溶液,并不是吸收恒量的入射光,而是吸收入射光的一个恒定部分。然而,用一个固定厚度的吸收层,则吸光率  $A$  与吸收溶质的浓度成正比。

克分子吸收系数是随吸光化合物的本质、溶剂和波长而变化的,如吸光物质同另一种通过获得或丢失质子而具有不同光谱的物质处于平衡状态,则克分子吸收系数也可能随 pH 而变化。图中表示在 pH 7.0 时嘌呤核苷酸的光谱(左图),和嘧啶核苷酸的光谱(右图)。相应的核糖核苷酸和去氧核糖核苷酸,及相应的核苷的光谱基本上是相同的。

通常采用 260 毫微米波长以测定核苷酸的混合物(图中垂直虚线)。下表列出在 260 毫微米和 pH 7.0 时  $\epsilon$  的数值。

核苷酸的克分子吸收指数	
	$\epsilon_{260}$
AMP	15,400
GMP	11,700
CMP	7,500
UMP	9,900
dTMP	9,200

5' 二磷酸核苷和 5'-三磷酸核苷,一般地用 NDP 和 NTP 表示,它们是比较强的酸,从它们的缩合磷酸根上可以分别离解出三个或四个质子。NDP 和 NTP 的缩合磷酸根,可同二价阳离子,如  $Mg^{2+}$  和  $Ca^{2+}$  形成络合物。由于细胞质中  $Mg^{2+}$  的浓度较高,故完整的细胞里核苷的 5'-二磷酸酯类和 5'-三磷酸酯类,主要以  $Mg^{2+}$  的络合物存在。这些络合物的意义将在第十五章讨论。NDP 和 NTP 末端的磷酸根可以用具有特异性的酶类有选择性

地水解掉,而不裂解其它的键。而且 NTP 的  $\beta$ -磷酸根和  $\gamma$ -磷酸根以及 NDP 的  $\beta$ -磷酸根可以在 1N HCl 中加热至 100℃ 7 分钟,水解产生无机磷酸盐,与此相反,这样处理 NMP 时,其  $\alpha$  或 5'-磷酸根是稳定的。这种差别使我们有可能在与 NMP 混合一起时对 NTP 与 NDP 之和作简单的分析。

NTP 有许多重要的功能。在种种涉及到化学能转移的重要酶反应中 ATP 是一种磷酸盐和焦磷酸盐的载体(第十五章)。在这些反应中,ATP 脱磷酸后所形成的 ADP 在呼

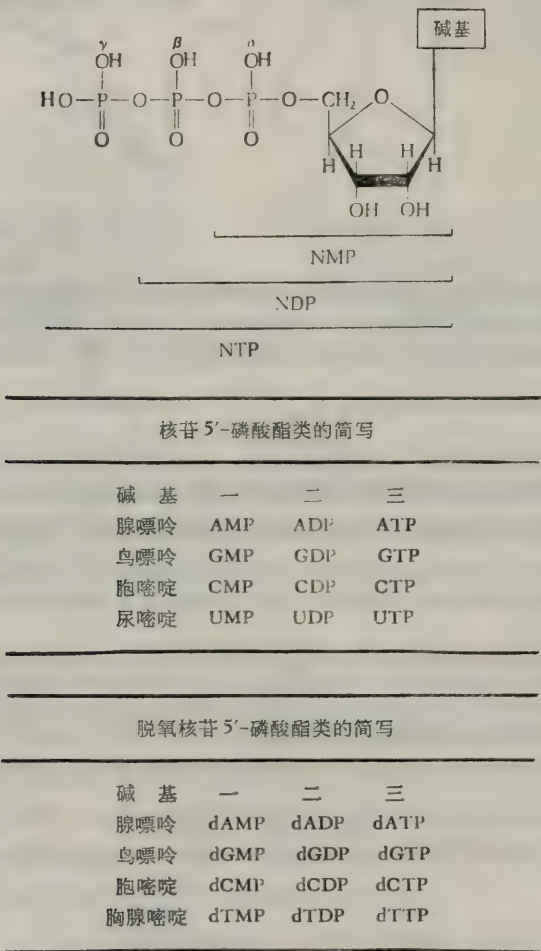


图 12-8 核苷 5'-、5'-二和 5'-三磷酸酯类 (NMP、NDP 和 NTP) 的一般结构。在相应的脱氧核苷磷酸酯类 (dNMP、dNDP 和 dNTP) 中,戊糖是 2'-脱氧-D-核糖。

吸过程中又可再磷酸化而生成 ATP。虽然 ATP-ADP 系统是细胞内磷酸根转移的主要或主线系统,而另外的 NTP,即 GTP、UTP 和 CTP 也在特殊的生物合成途径中提供化学能。(第十五章)

NTP 和 NDP 的第二个主要功能是,对特殊类型的基本单位分子起着辅酶样能量化了载体作用。例如,二磷酸尿嘧啶 (UDP) 是多糖类生物合成中糖残基的一种特有载体,又如二磷酸尿嘧啶葡萄糖(图 12-9),是糖原酶促生物合成中葡萄糖残基的特有供体。



与此相类似，在含胆碱的磷酸甘油酯的酶促生物合成中二磷酸胞嘧啶胆碱是磷酸胆碱的供体。(图 12-9)

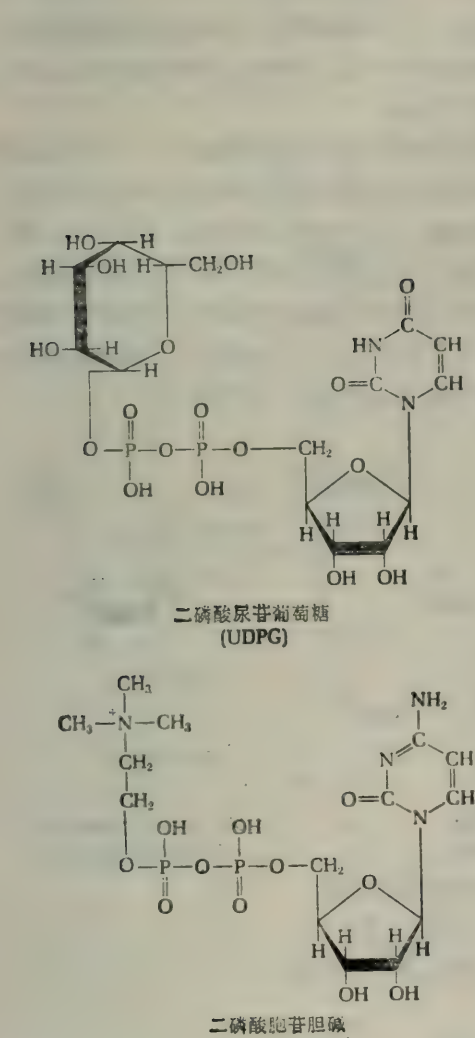


图 12-9 二磷酸尿苷葡萄糖和二磷酸胞苷胆碱

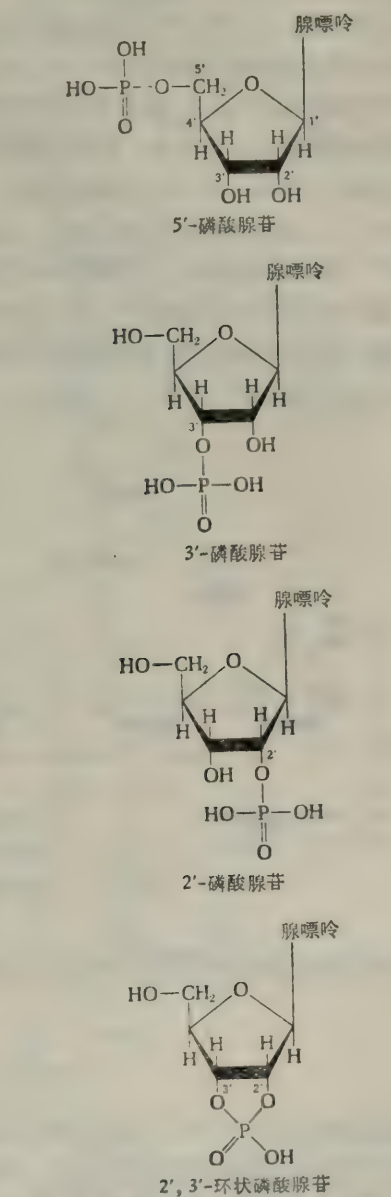


图 12-10 某些一磷酸腺苷类。用碱水解核酸的中间产物有 2'-, 3'-磷酸和 2',3'-环状磷酸腺苷。参考图 12-11。

NTP 和 dNTP 的第三个主要功能是,在 DNA 和 RNA 的酶促生物合成中,起着单核苷酸单位的高能前身物的作用。在这些反应中,dNTP 和 NTP 失去末端的焦磷酸根,变成核酸的一磷酸核苷残基。在 NTP 和 dNTP 的全部三个功能中蕴藏在  $\beta$ -与  $\gamma$ -磷酸根中的化学能皆用于促进新的共价键的形成。(第二十三—二十六和第三十一章)

## 其它的核苷酸类

除了刚讨论过的 5'-磷酸核苷类外,在生物体内还有磷酸根在其它位置上的核苷酸(图 12-10 和图 12-11)。2'-, 3'-环状磷酸核苷类和 3'-磷酸核苷类,分别是某些核酸酶水解 RNA 的某些核糖核苷酸链而生成的中间产物和最终产物。这些化合物也在 RNA 碱水解时产生,同样也产生 2'-磷酸核糖核苷类。(图 12-10)

在多种激素生化反应中,起着关键作用的有两种非常重要的核苷酸: 3', 5'-环状磷酸腺苷(缩写为环状 AMP 或 cAMP) 和 3', 5'-环状磷酸鸟苷(缩写为环状 GMP 或 cGMP)(图 12-11)。真核细胞的环状 AMP,是由于细胞膜上一种酶的作用而从 ATP 产生的。腺苷酸环化酶被某些从血流中来的激素所激活(第二十九章)。环状 AMP 称为第二信使,因为它能在细胞之内传递和扩大第一信使激素通过血流传达的化学信号。另外两个重要的核苷酸,现在已知它们参加细菌基因转录的调节,它们是 5'-二磷酸 3'-二磷酸鸟苷(缩写为 ppGpp)(图 12-11) 和 5'-三磷酸 3'-二磷酸鸟苷(pppGpp)。(图 12-11)

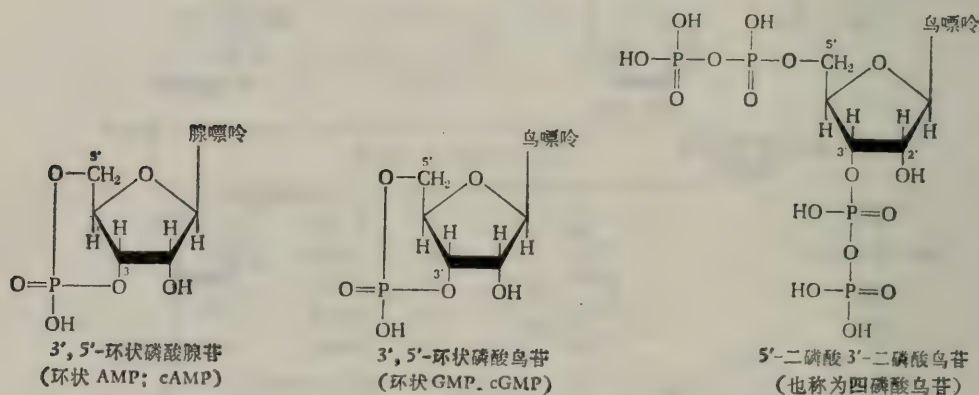


图 12-11 在调节机理中三种有活性的核苷酸

许多辅酶是核苷酸或核苷酸的衍生物,这些将在下一章讨论。

## 核 酸

脱氧核糖核酸 (DNA) 是由许多脱氧核糖核苷酸通过共价键连接而成的链。核糖核酸 (RNA) 是由核糖核苷酸组成的链。DNA 和 RNA 具有许多相同的物理和化学性质,因为两者中连续的单核苷酸单位都是通过相同方式以共价键连接的,也就是在一个核苷酸的 5'-羟基和下一个核苷酸的 3'-羟基之间以磷酸二酯桥共价连接而形成的。(图 12-12) 因此, DNA 和 RNA 两者的主链是由磷酸和戊糖基团交替组成的,其中磷酸二酯键提供共价连续性。核苷酸单位的嘌呤碱基和嘧啶碱基不参与主链结构,但它们构成有特色的侧链。正如氨基酸残基的 R 基团是多肽链有特色的侧链一样。

在详细讨论核酸的主链结构的化学性质以前,我们还必须扼要地叙述主要核酸的分类、化学组成和功能。这些方面将在第四部分再进一步讨论。



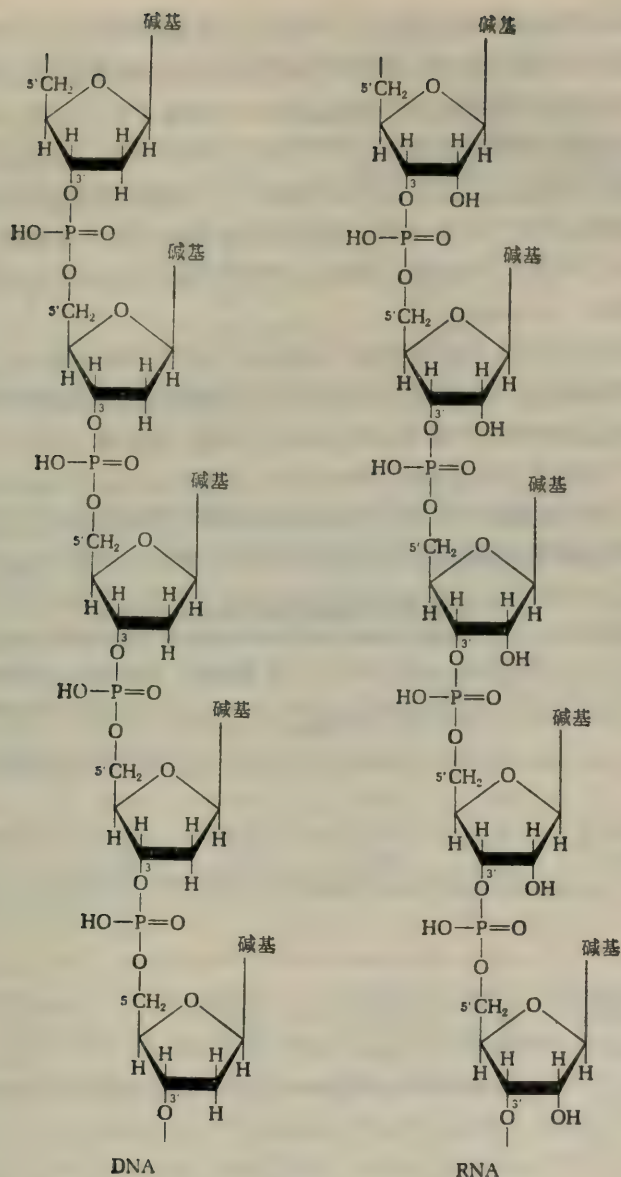


图 12-12 核酸链的共价主链结构

## DNA

瑞士人 Friedrich Miescher 从 1869 年开始在一系列著名研究中,首先从脓细胞和鲑鱼精子中分离出 DNA,因为它来自细胞核,他称之为“核素”。经过 70 多年的研究,才完全肯定了核酸的主要结构单位和主链结构。

来自不同细胞和病毒的 DNA 分子,在其四种主要类型核苷酸单体的比例上(表 12-2),在它们核苷酸顺序上和分子量上也都有差异。除了所有的 DNA 里都有四种主要碱基(腺嘌呤、鸟嘌呤、胸腺嘧啶和胞嘧啶)外,在某些 DNA 分子中还存在着少量的这些碱基的甲基化衍生物,特别是病毒的 DNA。从不同生物和病毒分离出来的 DNA 通常

是由两股成互补的双螺旋排列的(第三十一章)。大多数细胞中,由于它们的分子量太大,以致不易以完整形式分离出来。在只含有一条染色体的原核细胞中,全部 DNA 就是以单条双螺旋存在,也就是以双股的、分子量超过  $2 \times 10^9$  的大分子存在。在含有几条或许多条染色体的真核细胞内,相应地也有几个和许多个 DNA 分子。在细菌中 DNA 分子占细胞重量的 1%,存在于核区,它通常是附着在称为中介体的细胞膜的内折叠的一点上。细菌 DNA 上没有蛋白质和它缔合。有时在细菌的细胞浆中存在有染色体外的 DNA 小分子,这种 DNA 分子只携带少数基因,按照它们与染色体 DNA 的遗传关系,可称为质粒(plasmids)或游离体(episomes)。

在二倍体的真核细胞中,几乎所有的 DNA 分子存在于细胞核内,与称为组蛋白的碱性蛋白质以离子键相结合。除核中的 DNA 外,二倍体真核细胞的线粒体中也存在很少量 DNA,它的碱基成分和分子量都与核 DNA 不同。线粒体 DNA(mtDNA)的分子量大约为一千万。它的总量占全部核 DNA 的 0.1% 到 0.2%。叶绿体中也含有一种特殊小的 DNA 分子。许多病毒的 DNA 其分子量依病毒种类不同大约从 2 百万到 1 亿以上。病毒类型 DNA 的结构和生物学功能,在第三十一和第三十二章中再进一步讨论。

表 12-2 在某些核酸制备物中碱基克分子百分数

	腺 嘌 呤	鸟 嘌 呤	胞 嘧 啶	胸 腺 嘧 啶	尿 嘧 啶
DNA <sub>s</sub>					
人	30.9	19.9	19.8	29.4	—
大肠杆菌	24.7	26.0	25.7	23.6	—
噬菌体 $\lambda$	21.3	28.6	27.2	22.9	—
RNAs					
公牛肝脏(全部)†	17.1	27.3	33.9	—	21.7
大肠杆菌 mRNA	25.1	27.1	24.1	—	23.7
烟草斑纹病毒	29.8	25.4	18.5	—	26.7

† 混合物

RNA

细胞里有三类主要的核糖核酸,即信使 RNA(mRNA),核糖体 RNA(rRNA)和转移 RNA(tRNA)。虽然所有这三类 RNA 都是单股聚核糖核苷酸链,但每一类都有自己特异的分子量范围和沉降系数(表 12-3),而且这三类主要 RNA 的每一种又以多种分子形式存在。无论那个生物种类的核糖体 RNA 都有三种或更多的主要形式。转移 RNA 多达 60 种形式,而信使 RNA 则有几百或许几千种特殊形式。在大多数细胞中 RNA 的含量比 DNA 多 5—8 倍。

在细菌细胞中,大部分 RNA 都存在于胞浆中,虽然某些 RNA 在转录形成的过程中是以非共价键附着在 DNA 上。在真核细胞里各种形式的 RNA 都有特异的细胞内分布。在肝细胞中全部 RNA 约有 11% 是在细胞核里,约 15% 是在线粒体中,50% 以上是



在核糖体上以及大约 24% 是在胞液中 (cytosol)。象线粒体 DNA 一样, 线粒体 rRNA 和 tRNA 不同于线粒体外的形式。存在于某些病毒中的 RNA 将在本章后面再讨论。

表 12-3 大肠杆菌 RNA 的性质

类 型	S	分子量	核苷酸残基数目	占全部细胞 RNA 的百分比
mRNA	6—25	25,000—1,000,000	75—3,000	~2
tRNA	~4	23,000—30,000	75—90	16
rRNA	5	~35,000	~100	82
	16	~550,000	~1,500	
	23	~1,100,000	~3,100	

信使 RNA

信使 RNA 只含有四种主要的碱基,它是在进行转录过程中在核内合成的。转录时,染色体 DNA 链中的一股的碱基顺序通过酶促转录成单股的 mRNA。某些 mRNA 也在线粒体中制造。这样形成的 mRNA 链股的碱基顺序与原来被转录的 DNA 链股是互补的。转录后, mRNA 即转移到胞质中去,最后到达核糖体上。在这里它充当蛋白质合成时规定氨基酸排列次序的模板。虽然 mRNA 分子只构成细胞 RNA 总量的一个极小部分 (表 12-3), 但它们以多种形式存在, 它们的分子量和碱基顺序都有很大差异。细胞所合成的上千种不同蛋白质中的每一种,都由一种特有的 mRNA 或一个 mRNA 分子的片段编码。

真核细胞的信使 RNA, 在 3'末端含有大约 200 个连续腺苷残基的长顺序为其特点, 显然它们在 mRNA 从核转移到核糖体上的过程中起一定的作用。

转移 RNA

转移 RNA 是较小的分子,在核糖体上合成蛋白质过程中,它起着特定氨基酸的载体作用。它的分子量在 23,000 到 38,000 的范围内,沉降系数大约是 4 S。它们含有 75—90 个单核苷酸单位。存在于蛋白质中的 20 种氨基酸,每一种至少有一个相应的 tRNA, 某些氨基酸有多种 tRNA。例如,在大肠杆菌细胞中转移亮氨酸,就有五种显然不同的特有 tRNA。而且在真核细胞的线粒体上和胞质中,一种已知氨基酸可有不同类型的 tRNA。从不同种细胞中已分离出了许多不同的 tRNA。

转移 RNA 除了含有主要的嘌呤和嘧啶碱基外,还特殊地含有数量颇多的罕见碱基,甚至可占全部碱基的10%。此外, tRNA 也含有某些异常的单核苷酸,如假尿苷酸和核糖胸苷酸 (图 12-13)。转移 RNA 分子还有其它共同鉴定特征。所有 tRNA 多核苷酸链的一个末端含有一个末端鸟嘌呤残基,在所有 tRNA 的另一末端则含有胞苷酸-胞苷酸-腺苷酸 (C-C-A) 末端顺序。末端腺苷酸残基的 5'-羟基通过一个磷酸二酯桥连接到前面的胞苷酸残基的 3'-羟基上。末端腺苷酸残基的一个游离羟基通过酶促酰化同一个特定的  $\alpha$ -氨基酸产生装载了的 tRNA, 即氨酰基-tRNA。这个氨基酸残基在蛋白质生物合成时, 可经酶促转移到位于核糖体表面上正在伸延的肽链末端。(第三十三章)

tRNA 的结构和功能的详细情况将在下面和第三十三章深入讨论。

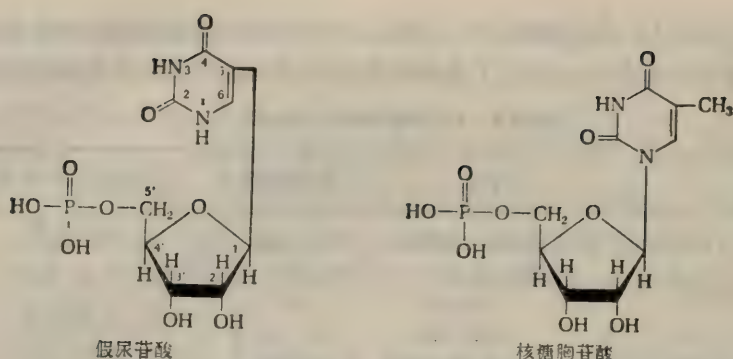


图 12-13 在 tRNA 中发现的两个异常核苷酸。在假尿苷中，N-糖苷键是在尿嘧啶的第 5 位置上，而不是在通常的第 1 位置上。核糖胸苷的异常在于，胸腺嘧啶正常存在于 DNA 中，而不存在于 RNA 中。

## 核糖体 RNA

核糖体 RNA (rRNA) 构成核糖体总重量的 65%，从大肠杆菌核糖体中可获得线状单股分子 rRNA，它们以三种特有的形式出现，其沉降系数分别为 23 S, 16 S 和 5 S，它们在碱基比例和顺序上都不同。真核细胞的核糖体比原核细胞的大，它含有 5 S, 7 S, 18 S 和 28 S 等四种类型的 rRNA。虽然 rRNA 占全部细胞 RNA 的一大部分，但它在核糖体里的功能还不清楚。rRNA 里有少数碱基是甲基化了的。

## 核酸主链的缩写

多核苷酸链的碱基顺序和共价结构，通常如图 12-14 所设计的那样。这些图将如我们下面会知道的，对核酸在化学或酶促水解过程中显示特殊键的破坏也很有用。此外，一

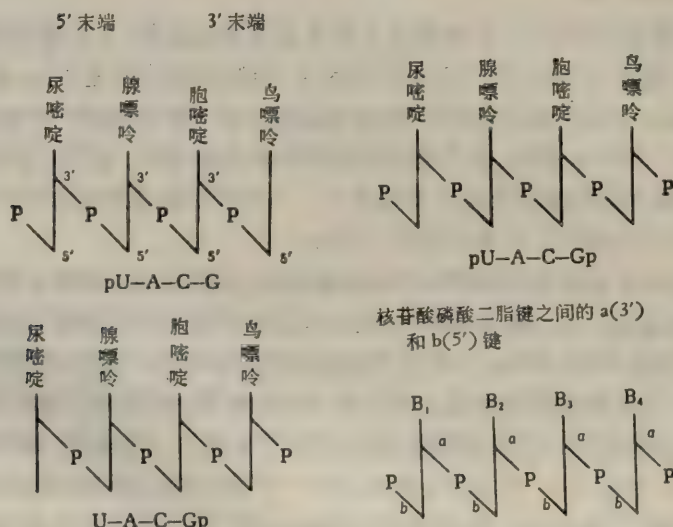


图 12-14 多核苷酸结构的图解和缩写法标志，垂直线代表主链的戊糖，数字 3' 和 5' 代表戊糖的碳原子，P 代表磷酸根。图解中总是从左到右表示 3', 5' 磷酸二酯键。如有必要时低聚脱氧核糖核酸的缩写法可包括前缀 d 在内。



种国际上公认的符号常用来表示多核苷酸的核苷顺序。RNA 的核苷是用 A, U, G 和 C 符号来表示。DNA 的核苷是用 dA, dT, dG 和 dC 来表示。字母 P 表示末端的一个磷酸根,一短横表示中间连接的一个磷酸根。当 P 出现在一个核苷符号的左边时,它代表磷酸酯是在第 5' 位置;而 P 写在碱基右边时,则代表磷酸酯在第 3' 位置上。因此 pA 表示是 5'-磷酸腺苷,而 Ap 则表示是 3'-磷酸腺苷。如图 12-14 中所示的低聚核苷酸 [oligo (希腊字),“少”] 可以很方便地表示出来。对 DNA 顺序的符号表示法,是在碱基符号前加一个前缀 d。如 dA-T-G-Gp。低聚核苷酸的 3' 末端,即其核苷是通过它的 5' 位碳与主链上前一个核苷酸的磷酸根相连接的那一端。

## 用酸和碱水解核酸

DNA 在 pH 3.0, 用酸温和水解时,所有嘌呤碱基有选择性地被水解掉,而嘧啶-脱氧核糖键或主链上的磷酸二酯键不受影响。因此产生的 DNA 衍生物不含嘌呤碱基,称为无嘌呤酸。嘧啶碱可在稍为不同的化学条件下,有选择性地水解掉,生成无嘧啶酸。

DNA 不能用稀碱水解,而 RNA 可以,因为 RNA 含有 2'-羟基。用稀 NaOH 处理 RNA,可产生一个含有 2'-和 3'-磷酸腺苷的混合物(图 12-10)。2', 3'-环状一磷酸是碱作用于 RNA 的初步产物和必然的中间产物。然后它们进一步被碱水解,碱作用于两个 P—O—C 键中的任何一个产生 2'-和 3'-一磷酸核苷的混合物(图 12-10)。这个机理的发现能解释用碱不能水解 DNA 的道理: DNA 没有 2'-羟基,因此不能形成必需的 2', 3'-环状一磷酸中间产物。2', 3'-环状一磷酸核苷也是某些核糖核酸酶作用的中间产物。(参看下面)

用酶或化学方法有选择性地水解断裂多核苷酸,可用于核酸碱基顺序的测定。在原理上,它使用了蛋白质的顺序分析中应用的同一逻辑。

## 核酸的酶水解

核酸被动物摄食后,在肠道中被胰脏分泌的核酸酶水解。分析核苷酸顺序时,这些和其它能水解核酸的酶都是重要工具。DNA 和 RNA 的磷酸二酯桥可被图 12-14 和表 12-4 中所命名的 a 和 b (或 3' 和 5') 两类酶水解。至于那种酶叫 a 那种酶叫 b 则取决于它们在磷酸二酯桥的那一边起作用。a 或 3' 酶专门水解 3' 碳和磷酸根之间的酯键,而 b 或 5' 酶则水解磷酸根和磷酸二酯桥的 5' 碳原子之间的酯键(图 12-14)。响尾蛇或 Russell's 毒蛇毒液中的磷酸二酯酶是最熟悉的 a 类酶,它能水解 DNA 或 RNA 中的所有的 3' 键,以 5'-磷酸核苷的形式释放出几乎所有的核苷酸单位。此酶需要在末端核苷酸残基上有一个游离的 3'-羟基,而且是从多核苷酸链的 3' 末端逐步水解的。这种酶和所有其它只作用于多核苷酸链末端的核酸酶都称为核酸外切酶。来自牛脾脏的一种磷酸二酯酶是 b 类酶的代表,它也是一种核酸外切酶,能水解 DNA 和 RNA 两者的全部 b 或 5' 键,因此只释放出 3'-磷酸核苷。它是从多核苷酸链上带有一个游离 5'-羟基的末端开始起作用的。

核酸内切酶不需要在链的末端有一个游离的 3'-或 5'-羟基,它们能作用于多核苷酸链上无论什么地方出现的某些 3'-或 5'-键。牛胰脏脱氧核糖核酸酶 I 是一种核酸内切

酶,它可催化 DNA 某些 a 或 3'键的水解,而产生平均大约含有四个核苷酸残基的低聚核苷酸。另一种核酸内切酶是从脾脏、胸腺或多种细菌中分离出来的脱氧核糖核酸酶 II,它能水解某些 b 或 5'键。(表 12-4)

同样地, RNA 可以由特异的 RNA 核酸酶降解。来自牛胰脏的晶体核糖核酸酶是一种核酸内切酶,它能水解那些其 3'键连到一个嘧啶核苷酸上的 RNA 5'键(图 12-14 和表 12-4)。因此核糖核酸酶作用的最终产物是含有嘧啶碱的 3'-磷酸核苷和末端是 3'-磷酸嘧啶残基的低聚核苷酸。一种环状 2', 3'-磷酸嘧啶残基是一种必然的中间产物,然后它被选择性地水解,产生末端是 3'-磷酸嘧啶的残基。来自霉菌 *Aspergillus oryzae* 的核糖核酸酶  $T_1$ ,能水解 3'-鸟苷酸残基和相邻残基的 b 或 5'碳原子之间的键。许多不同的核酸酶对不同类型核苷酸有特异性,对于断裂核酸与测定它们的核苷酸顺序是重要的工具。

### 核酸中核苷酸顺序的分析

遗传生化的中心问题是用实验去鉴定各种类型核酸的核苷酸顺序,因为它是贮存和传递遗传信息的主要途径。

正如用特异的酶和化学方法,有选择性地水解某一定肽键使有可能直接断裂多肽,以分析其氨基酸的顺序一样(第五章),有选择性地水解核苷酸之间的键,也可直接断裂核酸。但是对核酸顺序的分析一般是比较困难的,由于核酸只有四种主要的核苷酸,而蛋白质却含有 20 种氨基酸。识别核苷酸里具有特色的顺序是较困难的,因为模稜两可的机会较大。

表 12-4 作用于核酸的某些酶的特异性

酶	核 酸	特 异 性
a(3') 类核酸酶		
核酸外切酶		
蛇毒磷酸二酯酶	DNA 和 RNA	从 3'末端开始
核酸内切酶		
脱氧核糖核酸酶 I	DNA	某些 3'键
b(5') 类核酸酶		
核酸外切酶		
脾脏磷酸二酯酶	DNA 和 RNA	从 5'末端开始
核酸内切酶		
脱氧核酸酶 II	DNA	某些 5'键
核糖核酸酶 I (胰脏)	RNA	5'键,与其相连的 3'键是接到嘧啶核苷酸上
核糖核酸酶 $T_1$ (霉菌)	RNA	5'键,与其相连的 3'键是接到一个鸟嘌呤核苷酸上

首先从 tRNA 下手以解决问题,由于它们的链较短而且能分离成纯净的形式。1965 年 R. W. Holley 及其同事们第一次推论出了完整的 RNA 顺序,这是一个非常重大的实



验成就。原则上是采用了 Sanger 所引用的多肽链的氨基酸顺序的测定法(图 12-5)。用特异的核酸酶分裂酵母丙氨酸-tRNA 的 77 个单位的多核苷酸链使成一系列小低聚核苷酸碎片。分离这些碎片,再用核酸外切酶的作用以测定其碱基顺序(图 12-15),然后用另一种断裂法提供“重叠”才能将整个 tRNA 链的碱基顺序串连起来。丙氨酸 tRNA 含有九个具有次要碱基的核苷酸残基,它们可作为多核苷酸链的不同部位的有特色的标记。图 12-16 列出了这个特殊的酵母丙氨酸 tRNA 的完整碱基顺序。

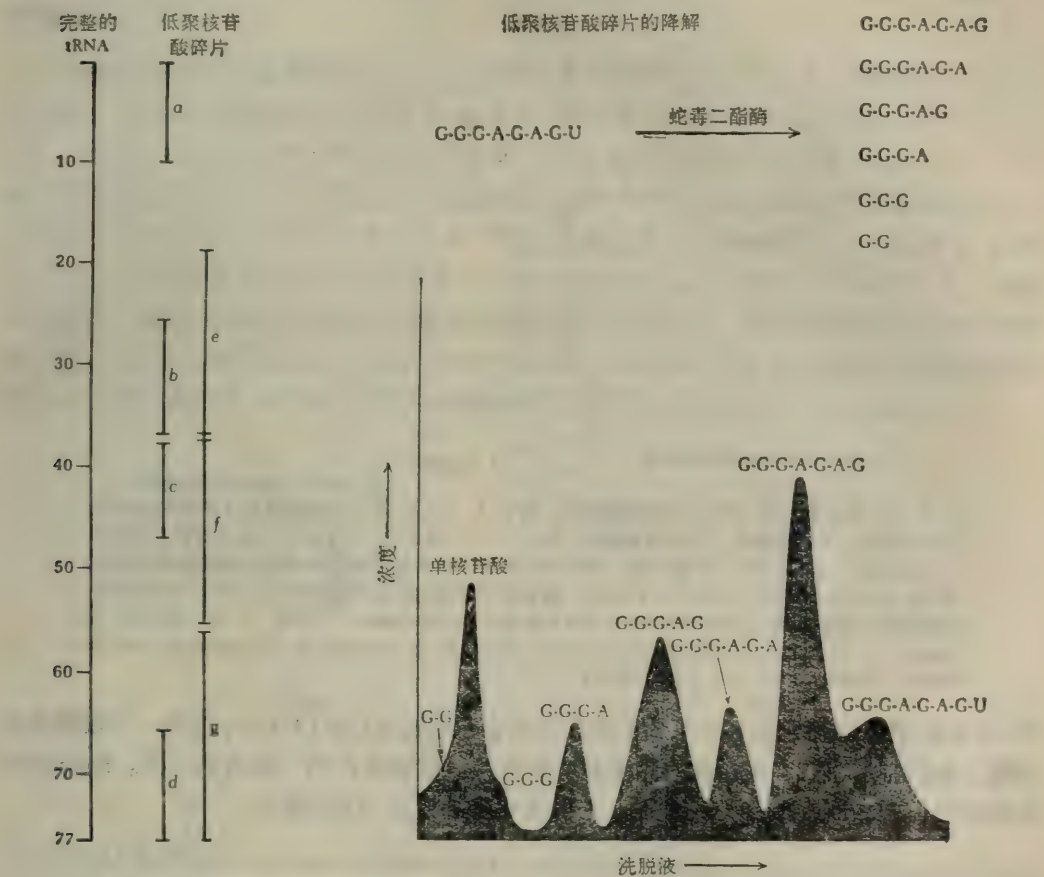


图 12-15 酵母丙氨酸 tRNA 的核苷酸顺序的分析。酵母丙氨酸 tRNA 是从所有其它的 tRNA 中用逆流分溶法首先分离出来的。然后用两种核酸酶 [一种得自胰脏 (a、b、c、d), 另一种从霉菌提出 (e、f、g)]。使完整的 tRNA 链 (77 个残基) 碎断成两类低聚核苷酸。再用柱层析法分离这些断片, 然后完全水解每一断片以测定其碱基含量。为了分析图中所示的单个断片的碱基顺序, 采用了蛇毒磷酸二酯酶, 从断片链的一端逐个移去其单核苷酸, 将获得的复杂混合物进行层析(图右下侧) 就可测出这一断片里的碱基顺序。必须经过多次的重复裂解和层析步骤。[R. Holley, *Scientific American*, 214:30 (1966)]

近几年来,已测出运载许多种不同氨基酸和来自各种生物的 40 多种不同的 tRNA 分子的完整单核苷酸顺序。从关于这一顺序的资料已得出了与 tRNA 分子有关的以下几个重要结论: 肯定了 tRNA 分子的构象; 各种氨基酸反密码的结构; tRNA 的进化, 以及 tRNA 的特殊次要碱基可能的功能。

tRNA 的结构被突破后不久, Sanger 和他的同事们已测定了大肠杆菌核糖体的 5 S

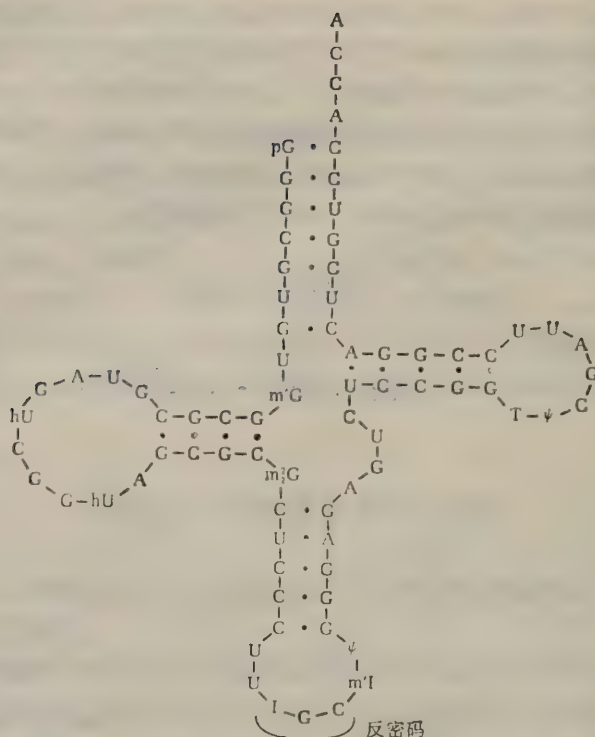


图 12-16 酵母丙氨酸 tRNA 的核苷酸顺序。除了 A, G, U 和 C 外,还用了以下符号代表核苷:  $\psi$  = 假尿苷, I = 次黄苷, T = 核糖胸苷, hv = 5,6-二氢尿苷, m<sup>1</sup>I = 1-甲基次黄苷, m<sup>1</sup>G = 1-甲基鸟苷, m<sub>2</sub>G = N<sup>2</sup>-二甲基鸟苷。两平行部分之间的黑点,表示互补碱基之间的氢键,所有的 tRNA 都具有一个类似三叶草叶片的结构。图中所示特有的反密码是能识别 mRNA 分子中丙氨酸密码的三联核苷酸。tRNA 结构的其它特色在第三十二章中叙述。[根据 R. W. Holley, J. Apgar, G. A. Everett, J. T. Madison, M. Marguise, S. H. Marrill, J. R. Penswick, and A. Zamir, *Science*, **147**:1462 (1965) 重绘]

rRNA 的顺序。因为它比 tRNA 分子较长又不含次要碱基(图 12-17),这是一个较困难的问题。他们使用了双向层析法,此法是分离低聚核苷酸碎片的一种有力工具。Spiegelman 和他的同事们已报告了一个含有 218 个单核苷酸残基的 RNA 顺序。

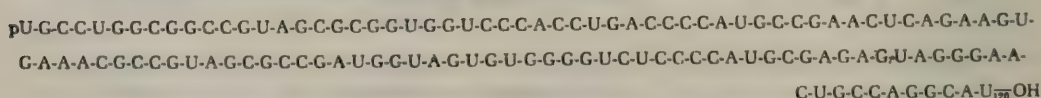


图 12-17 来自大肠杆菌的 5S RNA 的核苷酸顺序,它含有 120 个核苷酸残基。

测定 DNA 的单核苷酸顺序就困难得多了,因为即便是最小的 DNA 分子至少也含有 5,000 个单核苷酸单位,因此比 tRNA 和 5S RNA 长得多。而且,脱氧核糖核酸酶比核糖核酸酶对某些核苷酸间键的特异性小多了。然而,现在已经有某些重要的开端。新发现一类称为限制性核酸内切酶的脱氧核糖核酸酶类,已证明它对 DNA 的特异性断裂是很有效的。这些具有种属特异性的细菌酶在某些特殊点上可以裂解那些并非天然存在于酶由之而来的细胞中的 DNA 分子。限制性核酸内切酶的生物学功能是保护机体免受进入细胞的外来 DNA 的有害影响。另一条测定 DNA 样品顺序的途径通过 DNA 的化学修饰而成为可能,例如,产生外嘌呤酸或外嘧啶酸。



## 核酸-蛋白质超分子复合物

细胞中的某些核酸与蛋白质以非共价键相结合,构成超分子复合物。这些核酸-蛋白质系统有很复杂的结构和生物学功能,其中核糖体和病毒是了解得最清楚的。或许真核细胞的染色体是最复杂的核酸-蛋白质系统。

### 核糖体

核糖体是在所有类型细胞中存在的核糖核蛋白质颗粒,它们是蛋白质生物合成所不可少的。原核细胞的核糖体直径约 18 毫微米,粒子量约为 2.8 百万道尔顿,沉降系数为 70 S,它们是由 60—65 % rRNA 以及大约 35—40 % 的蛋白质组成的(图 12-18)。一个大肠杆菌大约含有 15,000 个核糖体,约占细胞干重的 25 %。真核细胞的胞质核糖体较大,并且在不同的生物体内其大小略有差异,它们的直径为 20—22 毫微米,其沉降系数为 73—80 S,大部分核糖体存在于胞质中,它们或呈游离状态或附着于内质网表面上。核糖体也存在于真核细胞的细胞核和细胞器如线粒体和叶绿体中。线粒体核糖体比胞质核糖体小些。原核细胞和真核细胞中的许多核糖体缔合成珠样的串,称为聚核糖体或简称聚核体。它是在蛋白质合成时,由许多核糖体附着到单个 mRNA 分子上而形成的。

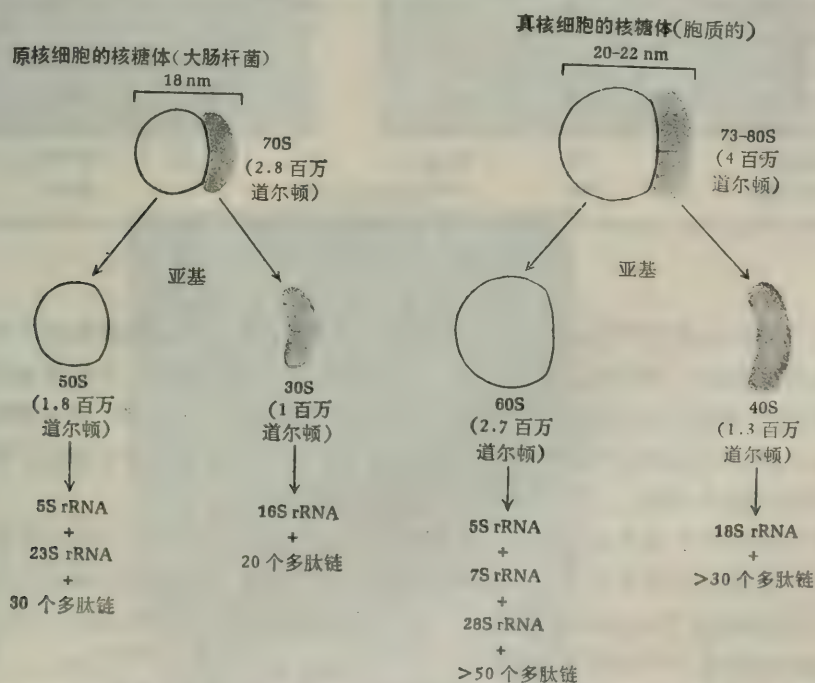


图 12-18 来自原核细胞和真核细胞的核糖体的结构。真核细胞核糖体含有两个具有特色的类型:胞质型核糖体(右图所示的)和线粒体型核糖体。线粒体中的核糖体较近似于原核细胞的核糖体。

所有细胞的核糖体都是按照同样的建筑方案构成的。它们有两个大小不相等的亚基(图 12-18)。大肠杆菌核糖体内的亚基的沉降系数为 30 S 和 50 S(颗粒量分别为 1.0 百万道尔顿和 1.8 百万道尔顿)。这 50 S 的亚基含有一个 23 S rRNA 分子和一个 5 S rRNA

的分子。而 30S 亚基含有一个 16S rRNA 分子。两者都含有很大数量的不同多肽链。真核细胞的核糖体含有较原核细胞核糖体中更大的 rRNA 分子和更多的肽链(图 12-18)。核糖体在含有较高  $Mg^{2+}$  浓度的溶液中常较稳定,但当  $Mg^{2+}$  浓度降低时就离解成它们的亚基。核糖体的结构和功能将在第三十三章和第三十六章中较详细地讨论。

对于原核细胞核糖体的结构组织和缔合的方式已有很多了解,用浓的盐溶液处理核糖体的亚基,可顺序地提取出一系列的特异蛋白质成分。将这些蛋白质成分除掉后,得到一种含有 rRNA 的核心和较紧密结合的蛋白质。通过恢复用抽提移去的蛋白质可以从这些核心重建完整的核糖体。完整缔合的细菌核糖体在第三十六章中讨论。

表 12-5 某些病毒的组成

	病毒重 (百万道尔顿)	核 酸	链的数目	核酸百分数	形 状	长 度 (毫微米)
大肠杆菌						
T2, T4, T6	~220	DNA	2	61	蝌蚪形	18
T7	38	DNA	2	41	蝌蚪形	6
$\phi$ X174	6	DNA	1 或 2	26	多面形	15
$\lambda$	50	DNA	2	64	蝌蚪形	20
MS2	3.6	RNA	1	32	多面形	17.5
植物病毒						
烟草斑纹病毒	40	RNA	1	5	杆状	300
蕃茄矮丛病毒	10.6	RNA	1	15	多面形	28
烟草坏死病毒	1.97	RNA	1	20	多面形	21
动物病毒						
脊髓灰质炎病毒	6.7	RNA	1	28	多面形	30
多瘤病毒	21	DNA	2	13.4	多面形	45
腺病毒	200	DNA	2	5.0	多面形	20
牛痘病毒	2,000	DNA	1	7.5	砖块形	230

## 病毒

曾恰当地被描述为“在生命的开始”的结构的病毒,主要是由核酸和许多特异的蛋白质亚基构成的颗粒。当它们进入到一定的宿主细胞时,有指导自己进行复制的能力。病毒能感染动物、植物和细菌细胞。细菌的病毒也称为噬菌体。在人类,很多疾病,例如脊髓灰质炎、流行性感冒和普通的感冒都是由病毒传播的。许多证据也暗示了某些类型的癌症是病毒引起或传播的,至少在某些动物品种中是如此。

虽然病毒的粒子重量非常大,它们却能以均一的形式分离出来并且许多病毒已制成了结晶。病毒颗粒或病毒粒子(virions)有附着到一定宿主细胞表面和输送病毒粒子感染部分(它们的核酸)进入到胞质的能力。然后病毒核酸垄断着宿主细胞生物合成机器,并强制它去合成病毒分子的分子组成,而不是合成宿主细胞的核酸和蛋白质。DNA 病毒里的 DNA 进入到宿主细胞以后,在转录互补 mRNA 时起着它的模板作用。而互补 mRNA 又能强占宿主核糖体的机器并使它合成病毒蛋白质以及合成病毒 DNA 时所需的酶类。RNA 病毒的 RNA 优先于宿主细胞的 mRNA 与宿主细胞核糖体结合。它然后充当合成病毒鞘膜蛋白质的模板,以及病毒 RNA 自我复制所需的外加酶类的模板。在某些情况下,病毒 RNA 能引起作为合成某些病毒蛋白质密码的 DNA 的合成。



病毒在大小，形状和化学组成上的差异相当大(表 12-5)。大肠杆菌噬菌体  $\phi X 174$  是一种较小的病毒,它的 DNA 大约有 5,000 个核苷酸残基。在较大的病毒例如大肠杆菌噬菌体 T 2, 其 DNA 可以含有多于 200,000 个残基。在较简单的病毒,例如烟草斑纹病毒只有一个单一类型的蛋白质亚基。但在噬菌体 T 2 中至少有 50 个不同种类的蛋白质亚基。

烟草斑纹病毒

噬菌体 T4

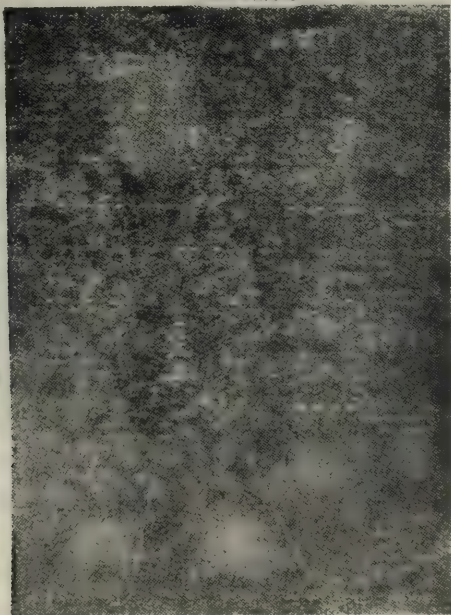


0.1  $\mu m$



0.1  $\mu m$

乳头病病毒



0.1  $\mu m$

图 12-19 病毒的电显微镜照片。

所有的植物病毒含有 RNA 或是杆状螺旋如烟草斑纹病毒,或是二十面体(20 边的),如蕃茄短丛病毒。动物病毒或含 DNA 或含 RNA。细菌病毒最适于做遗传学和生物化学的研究,因为它们在细菌悬浮液中大量复制且容易分离。最广泛研究的细菌病毒是大肠杆菌细胞的病毒,例如 DNA 噬菌体 T2, T4, T6,  $\phi$ X174 和 lambda ( $\lambda$ ), 以及噬菌体 Q $\beta$ , MS2 和 R17。

用电子显微镜和 X 射线衍射法已很详细地阐明了病毒的结构。三种病毒电子显微镜照片见图 12-19。病毒的其它方面如它们的遗传结构、复制和缔合情况将在第四部分讨论。

## 摘 要

核酸含有复现的单体单位称为核苷酸。核糖核酸的单体单位是核糖核苷酸,它是由一分子嘌呤碱或嘧啶碱,一分子 D-核糖和一分子磷酸构成的。脱氧核糖核酸的单体单位是脱氧核糖核苷酸,它含有 2-脱氧-D-核糖,而不是 D-核糖。嘌呤和嘧啶碱基是通过共价由  $\beta$ -N-糖苷键连接到 D-核糖或 2-脱氧-D-核糖的第 1 碳原子上。这样形成的化合物就是核苷。最大多数核苷酸所含磷酸是通过酯键与戊糖的 5'-羟基连接。常见的核糖核苷酸或含有嘧啶(胞嘧啶和胸嘧啶)中的一种,或嘌呤(腺嘌呤和鸟嘌呤)中的一种。而常见的脱氧核糖核苷酸,则或含有胞嘧啶和胸腺嘧啶中的一种,或含有腺嘌呤和鸟嘌呤中的一种。核苷的 5'-二磷酸和 5'-三磷酸衍生物也很重要,称为 5'-二磷酸和 5'-三磷酸核苷(或脱氧核糖核苷)类。核苷酸起着核酸的结构单位的作用,但也有其它的功能。在酶催化反应中,ATP 起着运载磷酸根的作用,UDP 和 GDP 起着运载糖基的作用,而 GDP 还起着运载氨基的作用。

核酸中的核苷酸单体,是由一个核苷酸单位的 3'-羟基和下一个核苷酸单位的 5'-羟基之间的磷酸二酯桥连接的。脱氧核糖核酸起着贮存和传递遗传信息的作用。它们大多数有极大的分子量,而在碱基的组成和顺序上有差异。至少有三种主要类型的核糖核酸:信使 RNA、转移 RNA 和核糖体 RNA。RNA 的功能在于表达 DNA 的遗传信息。

RNA 的核苷酸间键可用稀碱裂解,产生 2'-和 3'-磷酸核苷混合物。DNA 不能用碱裂解。DNA 和 RNA 都可以用蛇毒磷酸二酯酶类水解。由此方式只产生 5'-磷酸化的核苷。其它例如脾磷酸二酯酶可裂解磷酸二酯键的另一边,只生成 3'-磷酸化的核苷。这两类酶都是核酸外切酶。也已经知道对于某些单核苷酸对之间的键有特异性的核酸酶类,它们是降解核酸的重要工具。用胰核糖核酸酶水解 RNA 的办法只产生含有嘧啶的 3'-磷酸核苷类和以它们为末端的低聚核苷酸。稀酸裂解 DNA 的嘌呤产生无嘌呤酸。核酸的核苷顺序可从其链的断片推论出来,先测定断片的顺序,再利用重叠将其断片也放入固有的次序中去。许多 RNA 的碱基顺序已经确定了。

核酸与特定的蛋白质缔合成超分子的络合物,如核糖体和病毒。

## 参 考 文 献

关于核酸结构和功能的许多其它参考文献已列在第三十一—三十五章的末尾。



## 书籍

- Davidson, J. N.: *The Biochemistry of Nucleic Acids*, Academic, New York, 1972. Elementary paperback on all aspects of nucleic acid biochemistry.
- Fraenkel-Conrat, H.: *Design and Function at the Threshold of Life: The Viruses*, Academic, New York, 1972. Classic elementary account of virus structure and function.
- Kornberg, A.: *DNA Synthesis*, Freeman, San Francisco, 1974. Valuable, well-illustrated account of DNA biochemistry.
- Michelson, A. M.: *The Chemistry of Nucleosides and Nucleotides*, Academic, New York, 1963. Structure, laboratory synthesis, and chemical and physical properties are considered in detail. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*. A series of annual review volumes.
- Stewart, P. R., and D. S. Letham (eds.): *The Ribonucleic Acids*, Springer, New York, 1973. Comprehensive, up-to-date résumé of the biochemistry of RNAs.

## 论文

- Brownlee, G. G., F. Sanger, and B. G. Barrell: "The Sequence of 5S Ribosomal Ribonucleic Acid," *J. Mol. Biol.*, 34: 379—412 (1968).
- Holley, R. W., J. Apgar, G. A. Everett, J. T. Madison, M. Marguissee, S. H. Merrill, J. R. Penswick, and A. Zamir: "The Base Sequence of Yeast Alanine Transfer RNA," *Science*, 147: 1462—1465 (1965). The first determination of the base sequence of an RNA.
- Holmquist, R., T. H. Jukes, and S. Pangburn: "Evolution of Transfer RNA," *J. Mol. Biol.*, 78: 91—116 (1973). Comparison of the nucleotide sequences in tRNAs for different amino acids and from different species.
- Mills, D. R., F. R. Kramer, and S. Spiegelman: "Complete Nucleotide Sequence of a Replicating RNA Molecule," *Science*, 180: 916—927 (1973). Interesting account of the sequence analysis and evolutionary significance of an RNA molecule capable of replicating itself by action of a virus-induced RNA replicase.
- Mirsky, A. E.: "The Discovery of DNA," *Sci. Am.*, June 1968, p. 78. An absorbing account.
- Ts'o, P. O. P.: "Monomeric Units of Nucleic Acids: Bases, Nucleosides, and Nucleotides," p. 49 in *Fine Structure of Proteins and Nucleic Acids*, G. Fasman and S. Timasheff (eds.), Dekker, New York, 1970. A valuable comprehensive review of the structure and physical properties of the basic units of nucleic acids.

## 习题

1. 采用图 12-7 所列的克分子吸收系数, 试计算在 pH 7.0 时, 下列水溶液在 1.0 厘米厚度的比色杯中的吸光率 A<sub>260</sub> 毫微米值。

- (a)  $3.2 \times 10^{-3}$  MAMP
- (b)  $47.5 \mu\text{M}$  CMP
- (c)  $6.0 \mu\text{M}$  UMP
- (d) 一种  $4.8 \times 10^{-3}$  MAMP 和  $3.2 \times 10^{-3}$  MUMP 的混合物。

2. 采用图 12-7 的数据, 试计算在 pH 7.0 时, 下列水溶液的克分子浓度。

- (a) 一种 GMP 溶液的 A<sub>260</sub> 毫微米 = 0.325 (光程长 1.0 厘米)
- (b) 一种 dTMP 溶液的 A<sub>260</sub> 毫微米 = 0.090 (光程长 1.0 厘米)

3. 一种含有 AMP 和 GMP 的混合物溶液, 其吸光指数在 260 毫微米为 0.652 和在 280 毫微米为 0.284。已知克分子吸光指数如下, 试计算溶液中 AMP 和 GMP 的浓度。

AMP: A<sub>260</sub> 毫微米 =  $15.4 \times 10^3$ /克分子/厘米  
A<sub>280</sub> 毫微米 =  $2.5 \times 10^3$ /克分子/厘米  
GMP: A<sub>260</sub> 毫微米 =  $11.7 \times 10^3$ /克分子/厘米  
A<sub>280</sub> 毫微米 =  $7.7 \times 10^3$ /克分子/厘米

4. 指出下列的反应产物

- (a) 蛇毒磷酸二酯酶作用于 A-U-A-A-C-U。
- (b) 牛胰核酸酶作用于 A-U-A-A-C-U。

(c) 蛇毒磷酸二酯酶作用于  $dT-A-G-G-Cp$ 。

(d) 对  $dT-A-C-G-G-C-A$  的轻度酸水解。

(e) 对  $dT-A-C-G-G-C-A$  的轻度碱水解。

5. 一种硷基组成为  $A_2C_4G_2U$  的低聚核糖核苷酸与多种酶一起保温。用胰核糖核酸酶处理产生 2 克分子的  $Cp$ , 1 克分子含有腺嘌呤和尿嘧啶的二核苷酸, 1 克分子含有鸟嘌呤和胞嘧啶的二核苷酸和一克分子含有腺嘌呤、胞嘧啶和鸟嘌呤的三核苷酸。用高峰淀粉酶处理则得到游离的胞嘧啶、 $Ap$  和  $pGp$  各一分子, 及一个含有胞嘧啶、鸟嘌呤和尿嘧啶的三核苷酸和一个其它产物。(高峰淀粉酶是从霉菌制备的酶, 它能水解那些  $a$  键附着在含有嘌呤核苷酸上的低聚核糖核苷酸的  $b$  键)。用蛇毒磷酸二酯酶在有限时间内处理原来的低聚核糖核苷酸, 产生了一些  $pC$ 。试推论出这个低聚核糖核苷酸符合这些数据的顺序。

6. 一个硷基组成为  $A_2C_4G_4U_2$  的低聚核糖核苷酸用某些酶处理, 而且水解后测定出其产物的硷基组成。胰核糖核酸酶处理生成 3 克分子  $Cp$ , 1 克分子含有腺嘌呤和尿嘧啶的二核苷酸, 1 克分子只含有鸟嘌呤的二核苷酸, 一个含有鸟嘌呤和尿嘧啶的二核苷酸和一个含有腺嘌呤、胞嘧啶和鸟嘌呤的三核苷酸。用高峰淀粉酶处理则得到  $Ap$ 、两个  $Gp$  和三个三核苷酸, 其中一个含有腺嘌呤、胞嘧啶和尿嘧啶; 第二个含有胞嘧啶、鸟嘌呤, 第三个含有胞嘧啶, 鸟嘌呤和尿嘧啶。试推论出与这资料一致的这一低聚核糖核苷酸的顺序。

7. 一个已知其含有  $5'-AMP$ 、 $5'-CMP$ 、胞嘧啶核苷和胞嘧啶的样品, 样品的一部分放在一个 1.0 厘米光程的比色杯中, 从分光光度计上可读出以下结果:  $A_{260} \text{ 毫微米} = A_{280} \text{ 毫微米} = 0.500$ 。用硷性磷酸酶消化原样品的一部分 (10 毫升), 得到  $3.07 \times 10^{-7}$  克分子无机磷酸。取原来样品的 1.0 毫升测定其总核糖数得到  $3.87 \times 10^{-8}$  克分子。试计算出原来样品中 (a)  $5'-AMP$ , (b)  $5'-CMP$ , (c) 胞嘧啶核苷和 (d) 胞嘧啶的克分子浓度。用下面提供的克分子吸光率, 并假定这同一值适用于硷基、核苷和核苷酸。

$AMP: A_{260} \text{ 毫微米} = 15.4 \times 10^3 / \text{克分子} / \text{厘米}$

$A_{280} \text{ 毫微米} = 2.5 \times 10^3 / \text{克分子} / \text{厘米}$

$CMP: A_{260} \text{ 毫微米} = 6.47 \times 10^3 / \text{克分子} / \text{厘米}$

$A_{280} \text{ 毫微米} = 13.0 \times 10^3 / \text{克分子} / \text{厘米}$

【冥守惠译 任邦哲校】



## 第十三章 维生素与辅酶

活细胞除含有其自身大量的蛋白质、核酸、糖和脂类等成分外，还含有一些只需微量就能起作用的有机物质即维生素。尽管对许多生物来说这些物质对生命是极端重要的，但只有在人们懂得某些生物自己不能合成这些物质而必需从外界获得以后，维生素的重要生物意义才开始为人们所认识。

维生素的发现和认识是生物化学史上最重要的事件之一。它对人类的健康和幸福产生深远影响，也涉及到我们对活体新陈代谢中催化过程的了解。古代就早已发现饮食与疾病有关系。如很早就知道肝能治夜盲；十八世纪开始应用鱼肝油治疗佝偻病；稍后又发现一种叫 lime 的酸柑的果汁能预防英国水兵的坏血病（英国海员被称为饮用 lime 汁的人——limeys）。但直到 1912 年才由英国 F. G. Hopkins 用实验证明：要动物生长正常，它们的食物中单有蛋白质、脂肪和糖是不够的。他假定某些天然食物里含有一种或多种“补助因子”，这些也都是动物营养所必需的。同年 Casimir Funk 从稻的粗糠和细糠中提出一种胺的浓缩液，能减轻专吃精白米的日本水兵中流行的脚气病的症状。他创造了 vitamine 这个新名词，表明它是生命不可缺少的胺（由于这类物质中有许多都不是胺，故现改为 vitamin）。不久以后当美国人 E. V. McCollum 发现小鼠既需要脂溶性的又需要水溶性的生长因素时，事情就变得很清楚了，一定有好几种维生素。

由于这些早期的发现，终于导致使用大鼠或其它实验动物，从其养分中分离出动物所必需的微量因子这样一套系统研究方法。人们采用各种已知化学成分的物质，如蛋白质或氨基酸、脂肪、糖和矿物质等，按特定比例配制成合成饲料饲养幼小动物。单独使用这种饲料虽然不足以维持正常生长速度，但如能用富于生长因子的天然食物作补充时，便可观察到动物生长率增加。通过对生长因子的天然来源作系统的逐步分离，并对这些浓缩物对动物生长率的效应作出检定，人们终于获得了可以用化学方法进行鉴定的生长因素的纯净品。除观察生长率外，还可用皮肤鳞屑、皮毛蓬乱、步态异常等其它指标和（或）因维生素缺乏而引起的各种症状来检定维生素浓缩液的效价。由于肠道中有能合成某些维生素的微生物，人或实验动物有可能从中获得部分或全部所需维生素。因此要测定他们所需外源性维生素的精确数量是比较困难的。

到了二十世纪三十年代中期，维生素研究出现了一个引人注目的突破。初次分离出某些维生素并确定了它们的分子结构。这在当时确是实验室里的英雄业绩，因为人们往往要从几百磅甚至成吨的原料中仅能获得以毫克计算的纯净产品。仅在几年之内，硫胺素（维生素 B<sub>1</sub>）、抗脚气病物质、核黄素（维生素 B<sub>2</sub>）和烟酸、抗癞皮病因子等都鉴定出来了。不久以后又发现这些维生素是构成某些辅酶所不可缺少的成分。例如，现称为丙酮酸脱羧酶的这个酶，它在酵母的糖生醇发酵过程中具有催化丙酮酸脱羧变成乙醛和 CO<sub>2</sub> 的作用。此酶需要一种耐热的有机辅助因子，称为脱羧辅酶，由 K. Lohmann 和 P. Schuster 在 1936 年成功地分离出来。只在几个月里他们就发现脱羧辅酶含有一分子硫胺素或称维生素 B<sub>1</sub>。不久又证实核黄素和烟酸是糖的酶促氧化作用中必需的另一一些辅酶的重要成分。

这些发现不仅证明了许多维生素在生物中的作用；并说明了为什么这些物质只需极微量就能起作用的原因；而且也了解辅酶和酶类所促进的化学反应的分子机制指明了方向。

本章描述目前已知的主要维生素,它们的生物学作用的本质,以维生素作为必需组分的那些辅酶,并举出特殊酶促代谢反应中辅酶起作用的例子。

## 维生素的分类

维生素分为水溶性和脂溶性两大类(表 13-1)。除维生素 C 以外,所有水溶性维生素辅酶的功用皆已相当清楚。另外几种水溶性物质是某些生物生长所必需,但它们存在的比微量多,这类中包括:肌醇、胆碱和肉碱。

脂溶性维生素包括维生素 A、D、E、K。似乎只有高等动物才需要从外界获得这类维生素;在植物和微生物中脂溶性维生素的重要功用尚未确立。它们似乎并不充当辅酶成分,而是起另一方面的作用,其需要量极微。

表 13-1 维生素和它们的辅酶形式

类 型	辅酶或活化形式	促进功能
水溶性		
硫胺素	硫胺素焦磷酸 (TPP)	醛基转移
核黄素	核黄素单核苷酸 (FMN)	氢原子(电子)转移
	核黄素腺嘌呤二核苷酸 (FAD)	氢原子(电子)转移
烟酸	烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NAD)	氢原子(电子)转移
	烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (NADP)	氢原子(电子)转移
泛酸	辅酶 A(CoA)	乙酰基转移
吡哆醇	磷酸吡哆醛	氨基转移
生物素	生物胞素	羧基转移
叶酸	四氢叶酸	"1-C" 基转移
维生素 B <sub>12</sub>	辅酶 B <sub>12</sub>	氢原子 1,2 交换
硫辛酸	硫辛酰赖氨酸	氢原子与酰基转移
抗坏血酸	—	羟化辅助因子
脂溶性		
维生素 A	11-顺视黄醛	视循环
维生素 D	1,25 二羟胆钙固醇	钙磷代谢
维生素 E	—	抗氧化剂
维生素 K	—	凝血酶原生物合成

## 硫胺素(维生素 B<sub>1</sub>)与硫胺素焦磷酸酯

硫胺素是大多数脊椎动物的食物中和某些微生物所必需的。人类缺乏它引起脚气病,在鸟类则是多发性神经炎。继 Funk 早年成功地制成抗脚气病的浓缩液之后,1925 年 B. C. Jansen 又制成了晶体,美国生物学家 R. R. Williams 与其同事终于在 1935 年确定了它的分子结构。硫胺素是由一个取代了的嘧啶环和一个取代了的噻唑环通过甲烯桥互相连接而成(图 13-1)。在细胞里硫胺素主要是以其活跃的硫胺素焦磷酸酯这一辅酶形式存在,它曾被称为脱羧辅酶。



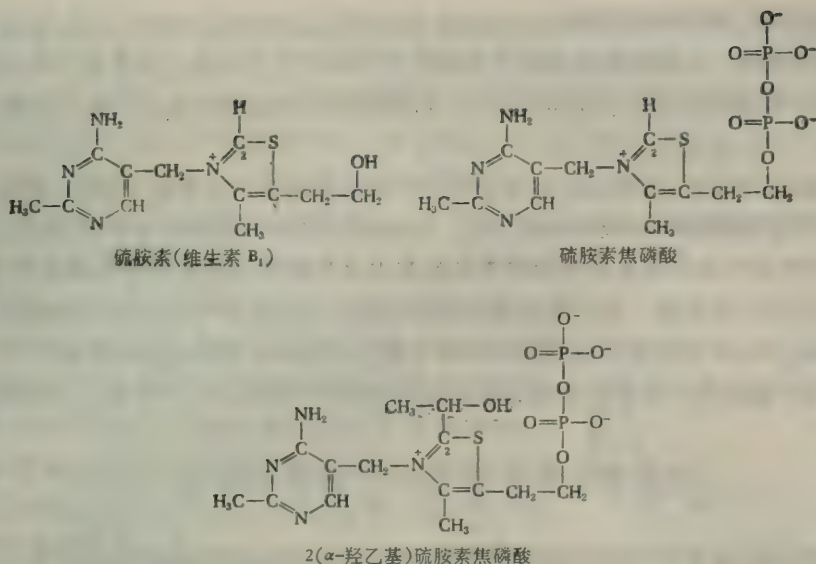


图 13-1 硫胺素与硫胺素焦磷酸。取代的噻唑是有活性的部分。

硫胺素焦磷酸酯在糖代谢主要途径中,充当除去醛基和(或)转移醛基两类酶促反应中的辅酶:即(1) $\alpha$ -酮酸的脱羧作用和(2) $\alpha$ -酮醇的降解或生成作用。在这些反应中,硫胺素焦磷酸酯的噻唑环作为以共价结合的“活性”醛基的临时载体。 $Mg^{2+}$ 也是必需的辅助因子。

关于硫胺素焦磷酸起辅酶作用机制的现代观点是由于发现单独有硫胺素存在就能促进丙酮酸的非酶促脱羧反应产生乙醛和  $CO_2$  的作用而出现的。对这种模型反应的研究,揭露出噻唑环第 2 位上氢原子极易离解生成负碳离子。后者在高温下与丙酮酸羧基碳原子作用产生  $CO_2$  和噻唑环的羟乙基衍生物。然后,羟乙基可能水解产生乙醛,或被氧化成酰基(图 13-2)。根据从模型反应中的推断已发现在有硫胺素焦磷酸存在的情况下,酵母丙酮酸脱羧酶作用于丙酮酸时,确有羟乙基硫胺素焦磷酸的形成。(图 13-1)

有关硫胺素焦磷酸功用的详细论述另载于丙酮酸的脱羧作用、 $\alpha$ -酮酸类的氧化作用和转酮酶对  $\alpha$ -酮醇的生成作用与利用。

当从实验动物饲料中去掉硫胺素时,各种组织利用丙酮酸的能力下降的程度不一致,表明有些组织牢固地保留着已结合的硫胺素焦磷酸,而另一些组织则通过代谢降解或排泄而较易丢失。例如,缺乏硫胺素的家鸽其脑组织由于没有这种辅酶,利用丙酮酸的能力下降得最明显,而其肌肉组织的活性却只有轻微的影响。这种不同组织间的差异说明为什么家鸽缺乏硫胺素的最初症状

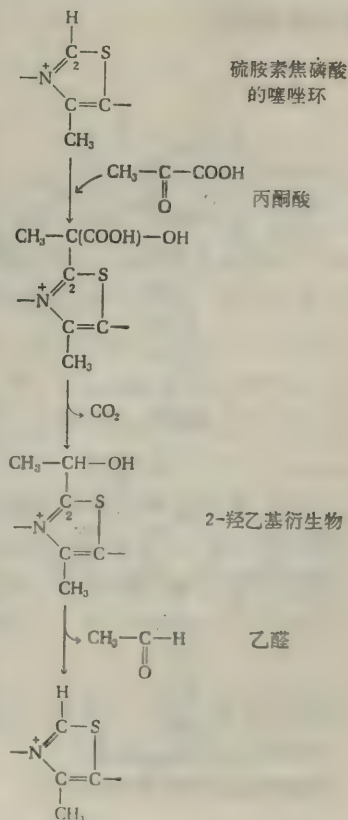


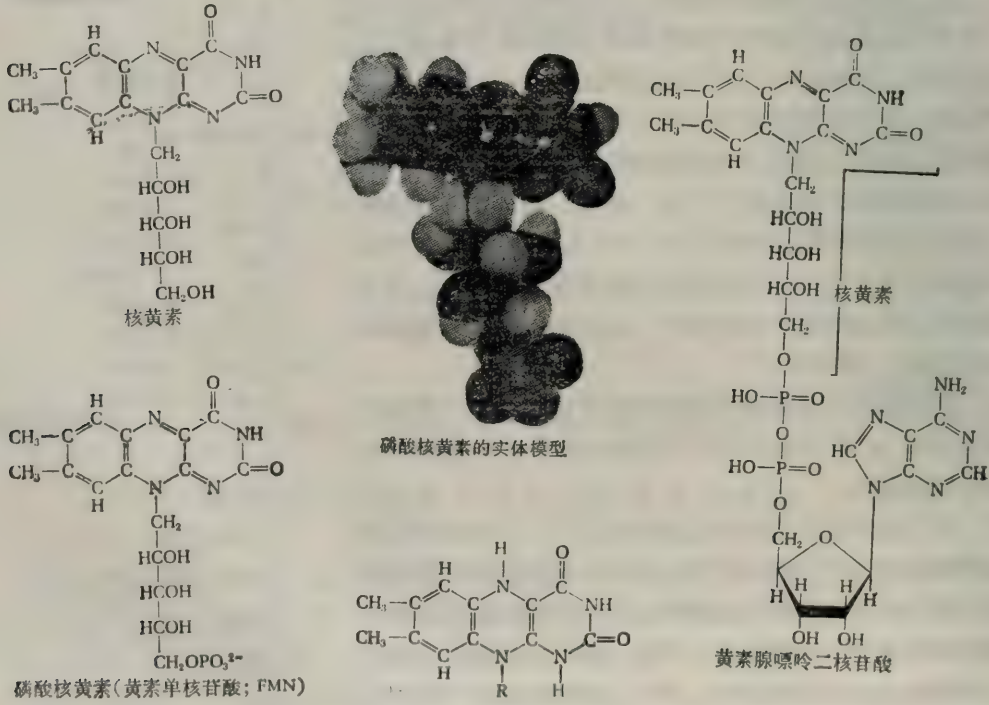
图 13-2 硫胺素焦磷酸在丙酮酸脱羧酶的丙酮酸脱羧作用中的作用步骤

是与姿势和协调有关的神经系统活动的缺陷；因此当鸟类缺乏硫胺素时，人们便采用多发性神经炎这一术语。这种组织差异的类似情况也适用于其它水溶性维生素，对于缺乏最敏感的组织，常随着维生素不同而有差异，很多情况下也随着动物种类的不同而有所不同。

喂食硫胺素类似物，如吡啶硫胺素或氧硫胺素也能诱发硫胺素缺乏症状，吡啶硫胺素即硫胺素分子上的噻唑环被吡啶环所取代，而氧硫胺素则是它的噻唑部分上的氨基换上羟基。可以设想这些没有维生素活性的类似物与本来和酶结合的硫胺素焦磷酸酯相竞争，或取代了后者在酶上的位置。肠内细菌含有硫胺素酶，它能在两个环之间分裂硫胺素而使它失活。用牲畜肠组织饲养农场的狐和貂所引起的 Chastek 麻痹症就与此酶有关。一般情况下，人类对硫胺素的摄取量多在边缘上，某些食物如白面包中常补充了这种维生素。

### 核黄素(维生素 B<sub>2</sub>) 与 黄素核苷酸

现已证明与核黄素相同或相关的黄色素，首先是从动物组织、蛋类和乳汁中分离出来的。从乳汁分离出来的黄色素初称为乳黄素，后来称核黄素，已发现它是狗和其它哺乳动物生长所必需的。1935 年欧洲化学家 R. Kuhn 和 P. Karrer 确定了核黄素的结构(图 13-3)，证明它是异咯嗪的一种衍生物。所有植物和许多微生物都能制造核黄素，但高等动物则不能。



黄素核苷酸上异咯嗪环的还原型，R 代表辅酶分子的其余部分。

图 13-3 核黄素与黄素酶



更早些时候瑞典 H. Theorell 和德国 O. Warburg 就推断黄素这种黄的色素是起辅酶作用的,他们发现参与还原型吡啶核苷酸氧化作用的一种酶含有一个黄色辅基,后来经 Theorell 鉴定为核黄素 5'-磷酸,又称黄素单核苷酸 (FMN)。稍后 1938 年 Warburg 发现另一种含核黄素的辅酶,即黄素腺嘌呤二核苷酸 (FAD)。FMN 不是真正的核苷酸,因为它不含戊糖,而是和 FAD 一样它含有糖醇(核糖醇)。

黄素核苷酸在称为黄素酶或黄素蛋白这一类氧化还原酶中起着辅基的作用。这类酶在丙酮酸脂酸和氨基酸的氧化降解中,以及电子转移过程中起作用。大多数黄素酶类上黄素核苷酸牢固地但并非共价地与蛋白质结合;琥珀酸脱氢酶则是例外,它的黄素核苷酸 FAD 与多肽链上组氨酸残基以共价键相结合。金属黄素蛋白类含有一个或多个金属作为附加辅助因子。在黄素蛋白酶类的催化循环中黄素核苷酸的异咯嗪环经受可逆的还原作用产生还原型核苷酸,可以  $\text{FMNH}_2$  和  $\text{FADH}_2$  等符号表示之。

氧化型的各种黄酶颜色都鲜明:它们具有独特的黄色、红色或绿色,这是由于在可见光波段内具有强烈的吸收光带的缘故。还原的时候,黄素酶类颜色变浅,同时吸收光谱也出现特殊改变(图 13-4),这对测定它们的特性非常有益。

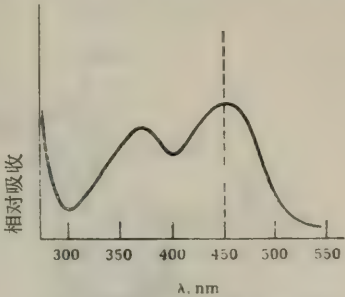


图 13-4 黄素核苷酸 (氧化形) 的吸收光谱还原作用使 450 毫微米峰消失

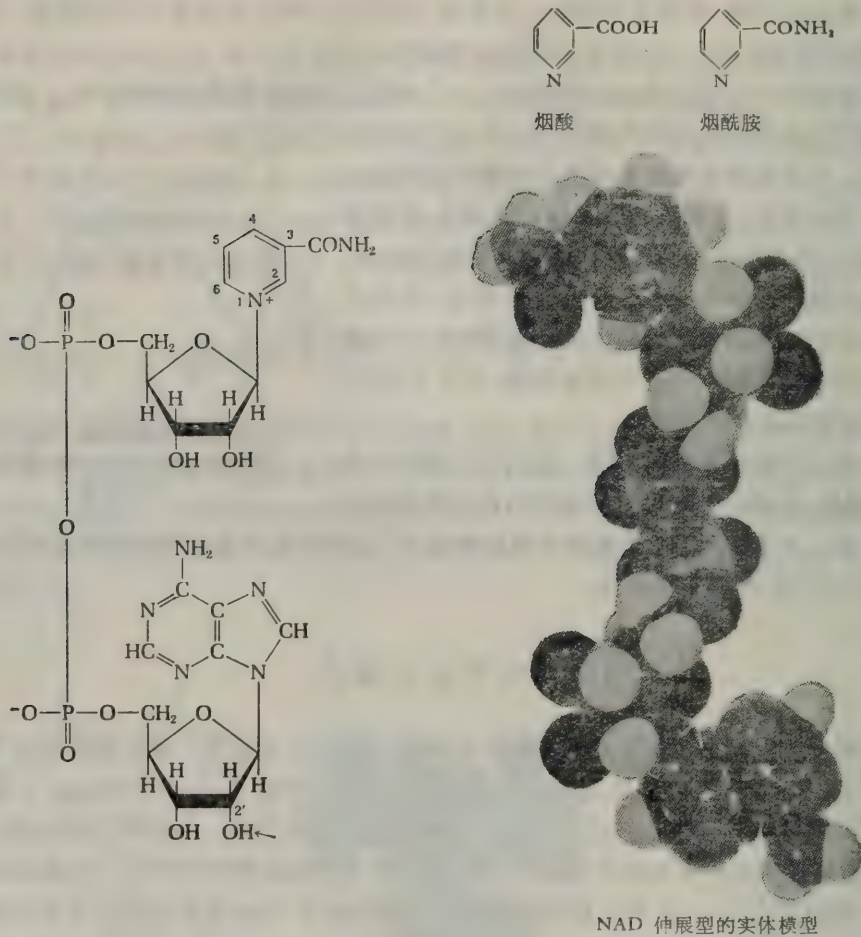
### 烟酸与吡啶核苷酸类

缺乏烟酸(图 13-5)导致人类癞皮病和狗的黑舌病。20 世纪初,癞皮病曾流行于美国南部的儿童中。1915—1920 年期间,美国公共卫生局的医师 Joseph Goldberger 对孤儿院儿童作了经典的营养研究,终于认清这是一种食物营养缺乏病。他证明此病是非传染性的,而与质量低的淀粉性食物有关,如能补充肉类、蛋类和乳类即可预防。然而与此有关的膳食中的因素直到 1937 年才查明是烟酸,这应归功于 1904 年开始的完全不同的生化研究方面所提供的线索。当英国生物化学家 A. Harden 和 W. J. Young 发现用酵母提取物使糖生醇发酵时,必须有一种既耐热又能透析的辅助因素。这种先称为辅酶或辅酶 I 的辅助因素,1933 年终于被瑞典 H. Von Euler 分离出来。1934 年 Warburg 和 W. Christian 又分离出一种极相类似的辅酶,当时称为辅酶 II。不久以后他们证明烟酸的酰胺,烟酰胺(图 13-5)是辅酶 I 和辅酶 II 的成分。这一发现很快使得美国生物化学家 C. A. Elvehjem 和 D. W. Woolley 在 1937 年证明烟酸就是能预防狗的黑舌病、人的癞皮病的营养因素。因为它是烟草中有毒的胍碱烟碱的一个组分所以称它为烟酸;从此以后又给予俗名尼克酸 (niacin)。

实际上,植物和多数动物能从其它前身物,特别是色氨酸合成烟酸。若以富于色氨酸的蛋白质大量供给动物,即使抽除饲料中的烟酸它们也不表现缺乏症状。然而,若食物中蛋白质含量低,可供制造烟酸的色氨酸不足则形成缺乏症。虽然癞皮病主要是由于缺乏烟酸但如伴有其它维生素和必需脂酸的缺乏,则通常病情将会更复杂。

图 13-5 列出含有烟酰胺为其必需成分的两种辅酶结构式。烟酰胺腺嘌呤二核苷酸

(NAD) 又称为二磷酸吡啶核苷酸 (DNP)，而烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (NADP) 则又称为三磷酸吡啶核苷酸 (TPN) [辅酶 I (或辅酶) 和辅酶 II 等陈旧名词已不再使用了]。由于烟酰胺是吡啶衍生物，这两种辅酶又常称为吡啶辅酶或吡啶核苷酸。



烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NAD)。烟酰胺部分是起可逆还原作用的部分 (右上角)；在磷酸烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NADP) 里用箭头指向的 2'-羟基是磷酸酯化了的。

图 13-5 烟酸与烟酰胺核苷酸

吡啶核苷酸作为统称与吡啶相连的脱氢酶类 (表 13-2) 这样一大群氧化还原酶的辅酶而起作用。这些辅酶在催化作用的循环中与脱氢酶蛋白结合较松，因而它们似乎更多地起了底物的作用而不是辅基的作用。在从特种底物分子上移除氢原子时，吡啶核苷酸起着电子受体作用。来自底物的一个氢原子以氢负离子 ( $H^-$ ) 的形式转移到氧化型辅酶 (以  $NAD^+$  和  $NADP^+$  符号表示) 的烟酰胺部位上，变成还原型辅酶 (分别以  $NADH$  和  $NADPH$  表示)；来自底物的另一个氢原子则变成成为氢离子 (图 13-6)。举一个与吡啶相连的脱氢酶催化的反应例子，即苹果酸脱氢酶所催化的苹果酸氧化成草酰乙酸 (图 13-6)，这是糖通过三羧酸循环氧化中的一个重要步骤。来自肝中的苹果酸脱氢酶对以  $NAD^+$  为辅酶有特异性而不接受  $NADP^+$ 。一般与吡啶相连的脱氢酶类或对  $NAD^+$  或对  $NADP^+$  有特异性，但有少数酶如谷氨酸脱氢酶将与两种辅酶都能作用。一般由吡啶核苷酸脱氢酶



催化的反应均可逆。 $\text{NAD}^+$  和  $\text{NADP}^+$  的还原型在 340 nm 处有特殊的最大吸收,可用于追踪与吡啶核苷酸相连的反应过程。图 13-6 表明  $\text{NAD}^+$  与  $\text{NADP}^+$  的吡啶环的 1 和 4 位置上被由底物转来的一个  $\text{H}^-$  离子所还原。

关于吡啶核苷酸和与吡啶有关联的脱氢酶的其它重要性质详见第十七和十八章。

表 13-2 与吡啶有关联的脱氢酶

与 NAD 有关联的
异柠檬酸
D-β-羟丁酸
3-磷酸甘油醛
二氢硫辛酰胺
L-β 羟酰-CoA
乙醇
乳酸
3-磷酸甘油
L-苹果酸
与 NADP 有关联的
异柠檬酸
6-磷酸葡萄糖
NAD 或 NADP
L-谷氨酸

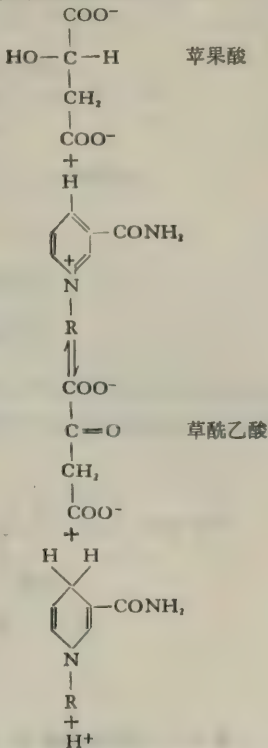


图 13-6 苹果酸脱氢酶反应, 标明被酶移走的氢原子的途径。一个以  $\text{H}^-$  离子形式转移到吡啶环的 4 位上, 另一个以  $\text{H}^+$  离子形式在介质中出现。

### 泛酸与辅酶 A

泛酸(图 13-7)是首先由 R. J. Williams 发现的一种含硫的生长因素, 植物和大多数微生物能制造它, 但为脊椎动物食物中所必需。发现后不久就知道在组织里泛酸是以一种低分子量的结合或化合形式存在。N. O. Kaplan 和 F. Lipmann 早就发现某些酶促乙酰化反应中需要一种耐热的辅酶, 然而直到 1948 年他们才鉴定出这种结合形式就是辅酶 A(A 代表乙酰)。

在涉及脂酸氧化、脂酸合成、丙酮酸氧化和生物乙酰化作用的酶促反应中, 辅酶 A 起着运载乙酰基的作用。1951 年德国生化学家 F. Lynen 确定了辅酶 A 运载乙酰基精确的化学机制。他从酵母中分离出一种“活泼的”乙酸, 并且证明它是由辅酶 A 的硫醇(或 SH)基与乙酸构成的硫醇酯(图 13-7)。辅酶 A 简写成 CoA (或  $\text{CoA}-\text{SH}$ , 此式强调硫醇基的作用)。

乙酰辅酶 A (乙酰 CoA) 是在丙酮酸或脂酸酶促氧化过程中产生的, 在有乙酰 CoA 合成酶存在时也能自游离乙酸产生。

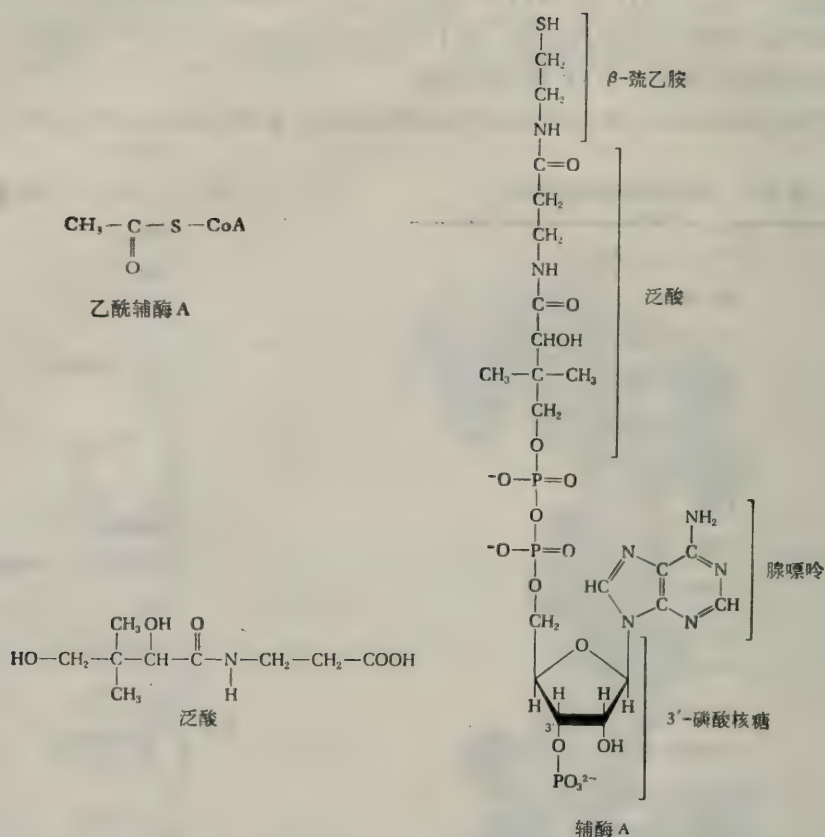
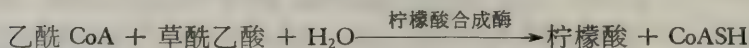
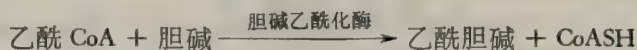


图 13-7 泛酸与辅酶 A。巯基在酶利用 CoA 作为酰基载体时被酰基酯化变成一个硫酯。



如此生成的乙酰 CoA 可由酶催化与乙酰基受体作用，如与胆碱作用产生乙酰胆碱，或与草酰乙酸作用产生柠檬酸，如下反应：



在非酶促模型反应中，像乙酰 CoA 这种硫醇酯与相应的氧酯比较，前者是更有效的乙酰化剂，这是由于硫酯键比氧酯的共振稳定性更弱的缘故。涉及辅酶 A 的酶促反应将在各处细述。

## 维生素 B<sub>6</sub> 与吡哆醇辅酶

维生素 B<sub>6</sub> 首先被鉴定为大鼠营养物中防止一种称为肢痛症的皮肤病所必需的成分。1938 年分离出一种晶体物质并鉴定出它具有这种活性称为吡哆醇(图 13-8)。E. Snell 与同事继后的工作证明吡哆醇在生物体内转变成吡哆醛和吡哆胺，这两种化合物是具有更高活性的细菌生长因素，而且是这种维生素活性型的更直接前身物。维生素 B<sub>6</sub> 具有活性



的辅酶形式是磷酸吡哆醛和磷酸吡哆胺。(图 13-8)

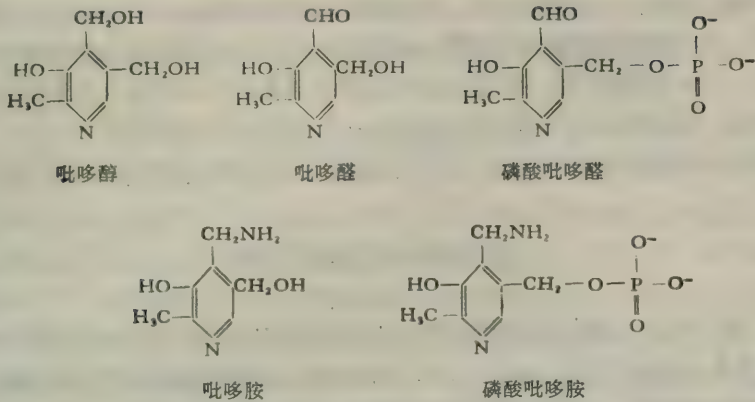


图 13-8 吡哆醇(维生素 B<sub>6</sub>)及其辅酶形式

吡哆素辅酶类非常多能，在许多种酶促的有氨基酸或氨基的转变或转移的不同反应中都能起作用。最普通的要以磷酸吡哆醛为辅酶的酶促反应是转氨作用，即氨基酸的  $\alpha$ -

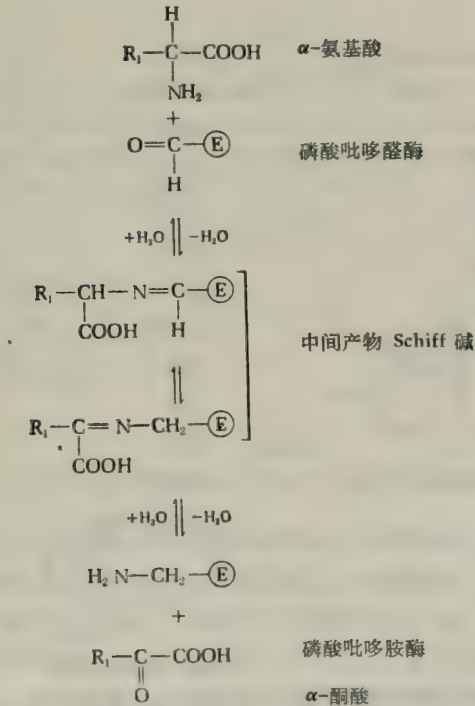


图 13-9 磷酸吡哆醛在转氨酶中的作用。氨基酸的氨基与磷酸吡哆醛的羰基作用，紧密与酶结合生成 Schiff 碱这个中间产物，然后变成它的互变式，再水解成相应的  $\alpha$ -酮酸，氨基则留给酶，通过共价结合成为磷酸吡哆胺。氨基化了的转氨酶通过这一系列反应的逆过程转移它的氨基给另一个  $\alpha$ -酮酸而得到相应的氨基酸。

氨基转移到  $\alpha$ -酮酸的  $\alpha$ -碳原子上。催化这种反应的酶称为转氨酶或氨基移换酶。我们对于这些辅酶功能的了解来自于 Snell 与其同事的模型实验。在这种模拟反应中,他们发现吡哆醛在 100℃无须酶促就能与谷氨酸反应生成吡哆胺和  $\alpha$ -酮戊二酸。Snell 以及苏

联的 A. Braunstein 根据这个事实和其它观察,提出磷酸吡哆醛能起辅酶作用是因为它的醛基能与底物氨基酸的  $\alpha$ -氨基作用,在与酶结合的磷酸吡哆醛和氨基酸之间生成 Schiff 碱(图 13-9)。然后氨基酸脱去氨基变为  $\alpha$ -酮酸;所生成结合在酶上的吡哆胺又与称为氨基受体的另一个  $\alpha$ -酮酸作用,在与上述相反的化学反应中,产生一个新的氨基酸和与酶结合的吡哆醛。转氨酶反应使我们想起它是一个双置换反应的例子。

有关磷酸吡哆醛的辅酶作用的几个特殊例子及其详情,将在本书它处提到。

## 生物素与生物胞素

生物素(图 13-10)是由荷兰生化学家 F. Kögl, 1935 年从已知含有酵母生长因素的肝浓缩液中首先分离出来的。随后 V. du Vigneaud 与其同事阐明了它的结构。生物素含有融合的咪唑和噻吩环。生物素能保护动物使它们在喂以生卵白时不至产生一种奇特的中毒现象。因为肠道细菌能制造生物素,故单纯从食物中抽去此种维生素时也不易出现缺乏症状。然而生卵白由于它含有一种蛋白质,称为抗生物素蛋白质,能特异地与生物素紧密结合并防止它从肠道中吸收,因而能产生生物素缺乏症。食用大量生卵白的人们也曾发现过生物素缺乏症。

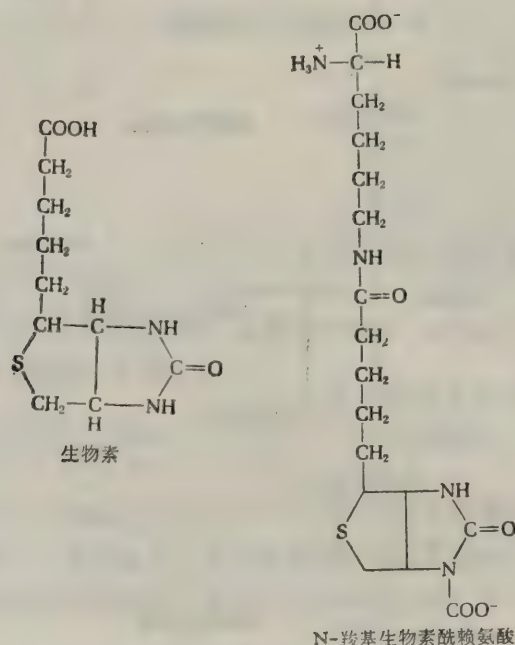
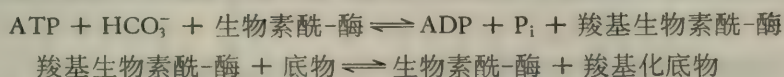


图 13-10 生物素与酶的赖氨酸残基的生物素衍生物的羧基化形式,此物能将其羧基(右下角)转移到乙酰-CoA 或其它受体上。

多年来对生物素的作用机制不甚明了,但终于发现它作用于二氧化碳的酶促转运或掺入过程。M. D. Lane 和 Lynen 发现生物素存在于与丙酰 CoA 羧化酶共价结合的辅基内。生物素分子以取代酰胺形式与酶蛋白特异赖氨酸残基的  $\epsilon$ -氨基相结合成为生物素酰赖氨酸,即生物胞素(图 13-10)。结合的生物素以一种极不稳定的羧基生物素衍生物(图 13-10)形式,在某些酶如丙酰 CoA 羧化酶及乙酰 CoA 羧化酶等羧化酶类的作用过程



中充当二氧化碳的中间载体。这种羧化反应的全过程可用下列反应式表示



## 叶酸及其辅酶形式

叶酸 (Folic Acid; 来自拉丁文 folium, 即叶) 广泛存在于植物中, 首先是从菠菜叶中发现的, 哺乳类缺乏它就出现生长不良和各种形式的贫血症。它由 (1) 取代的蝶啶; (2) 对氨基苯甲酸和 (3) 谷氨酸等三种独特的基本结构单位所组成。叶酸又名蝶酰谷氨酸或 (folacin) 叶酸 (图 13-11)。蝶啶是蝶呤类的双环含氮亲族化合物, 后者又是 2-氨基-4-羟基蝶啶衍生物。有些蝶呤如黄蝶呤 (图 13-12) 是昆虫眼和翅的色素。叶酸中的蝶呤是 6-甲基蝶呤。有些化合物中的叶酸通过谷氨酸的  $\gamma$ -羧基与一个或多个附加谷氨酸残基结合; 而这些附加谷氨酸残基则又通过它们的  $\gamma$ -羧基形成肽链而互相连接。有些生物只需要叶酸的 对氨基苯甲酸部分, 如有这一部分它们就能合成叶酸。

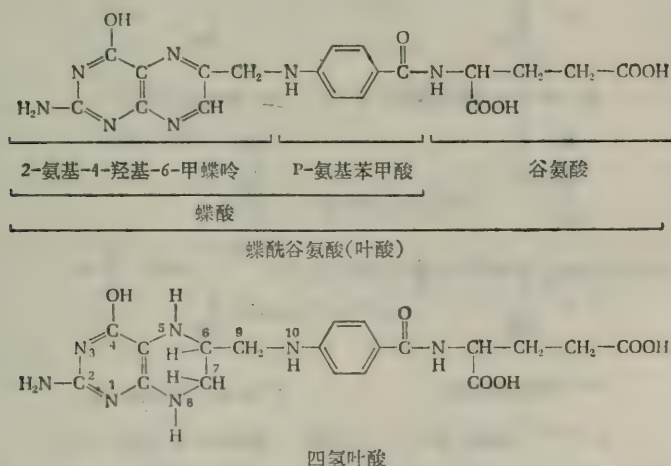


图 13-11 叶酸与四氢叶酸的结构。N<sup>5</sup> 与 N<sup>10</sup> 这两个氮原子参与 1-C 基转移。

缺乏叶酸最突出的生化症状是嘌呤类和嘧啶中的胸嘧啶的生物合成发生障碍。对酶和代谢的研究表明, 叶酸的辅酶功用在于转移某些一碳基团用于各种各样生物合成途径。叶酸经过两步还原作用转变成成为它的辅酶形式四氢叶酸 (图 13-11)。四氢叶酸常缩写成 FH<sub>4</sub>, 它是羟甲基 (—CH<sub>2</sub>OH), 或甲基 (—CH<sub>3</sub>), 或甲酰基 (—CHO) 的中间载体, 在许多酶促反应中这些基团常从一种代谢物转移到另一种代谢物, 或互相转化。图 13-13 标明 N<sup>5</sup>, N<sup>10</sup> 亚甲基四氢叶酸及其它在酶促反应中具有活性的四氢叶酸一碳基衍生物的结构。这类复杂的一碳基转移反应中的某些反应将在讨论氨基酸嘌呤和嘧啶中间代谢时详述。

下面举出一系列酶促反应, 在其中丝氨酸的羟甲基由酶促反应移去以生成四氢叶酸的 N<sup>5</sup>, N<sup>10</sup>-亚甲基衍生物, 它即还原成 N<sup>5</sup>-甲基衍生物。后者又将其甲基给予同型半胱

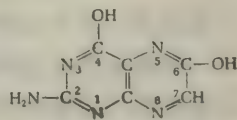
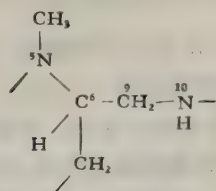
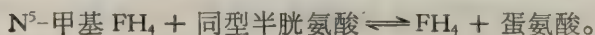
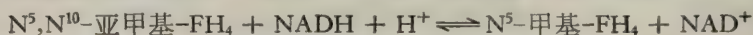
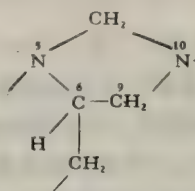


图 13-12 黄蝶呤 (2-氨基, 4, 6-二羟基蝶呤)

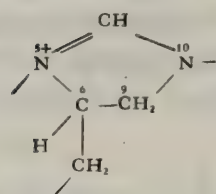
氨酸生成蛋氨酸。四氢叶酸就这样起着穿梭作用，而一碳基则以共价但又短暂地附于其上：



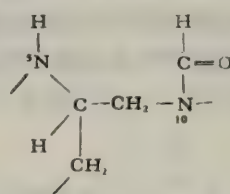
N<sup>5</sup>-甲基四氢叶酸



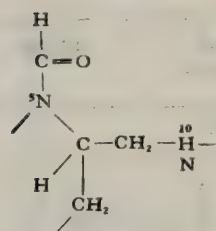
N<sup>5</sup>, N<sup>10</sup>-亚甲基四氢叶酸



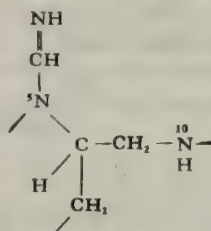
N<sup>5</sup>, N<sup>10</sup>-甲川四叶酸



N<sup>10</sup>-甲酰四氢叶酸



N<sup>5</sup>-甲酰四氢叶酸



N<sup>5</sup>-亚胺甲基四氢叶酸

图 13-13 四氢叶酸的 1-C 衍生物。(其完整结构见图 13-11)

## 硫 辛 酸

硫辛酸 (Lipoic Acid 有时也称 thiocetic Acid) 最初是由美国生物化学家 L. J. Reed 和 I. C. Gunsalus 和他们的同事在 1953 年从肝提出液中分离它的晶体;以吨计的肝中仅提出几毫克来。这个比较简单的八碳维生素 (图 13-14) 有两种形式:一种是环状二硫化物,另一种是前者的还原直链型二氢硫辛酸,后者在第 6 和第 8 位上有两个巯基。这两种形式通过氧化还原反应能迅速地相互转化。

丙酮酸和其它  $\alpha$ -酮酸的氧化脱羧反应很复杂,有多种辅酶参加,硫辛酸作为其中的一种而起作用。丙酮酸首先失去羧基 (图 13-15) 生成与酶结合的硫胺素焦磷酸的羟乙基衍生物。后者再与结合在二氢硫辛酰转乙酰酶上的硫辛酸作用,通过电子与酰基的转移而生成 6-乙酰二氢硫辛酸。随后的反应就是乙酰基转移到辅酶 A 和把电子转移到  $\text{NAD}^+$  上,使硫氢基再氧化生成氧化型或环状二硫型硫辛酸。这就是硫辛酸的再生过程。硫辛



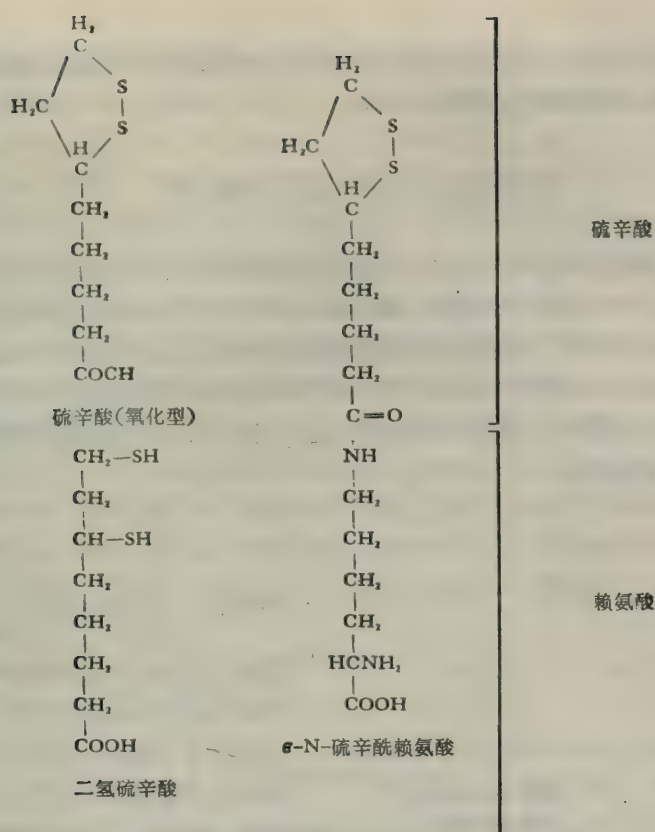


图 13-14 硫辛酸及其衍生物

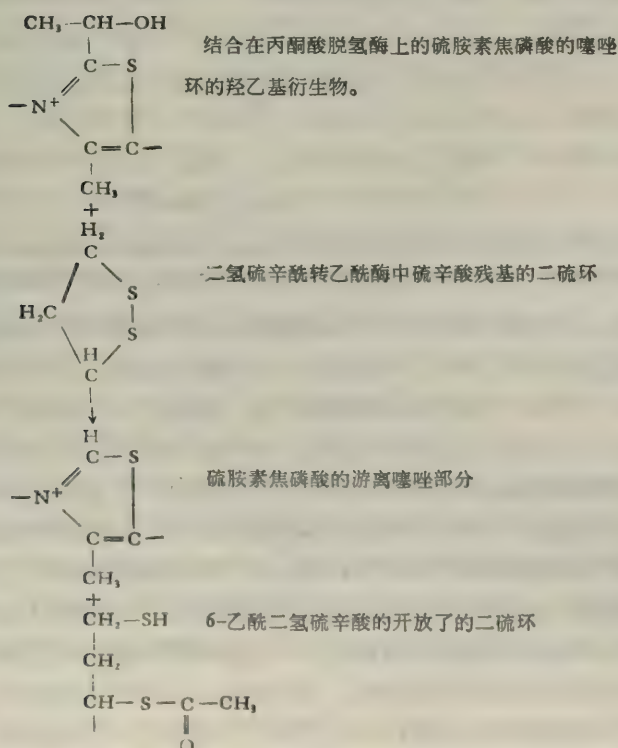


图 13-15 从硫胺素焦磷酸转移氢原子与一个乙酰基到硫辛酸,此反应步骤在丙酮酸氧化脱羧作用中出现。这是一个需要三种酶依次作用的复杂反应。也可参看图 13-1 与 13-2。

酸通过酰胺键与二氢硫辛酰转乙酰酶上特异赖氨酸残基的  $\epsilon$ -氨基共价结合; 此种硫辛酰赖氨酸残基也称为硫辛酰胺。(图 13-14)

## 维生素 B<sub>12</sub> 与 B<sub>12</sub> 辅酶类

维生素 B<sub>12</sub> 的历史是非常有趣的, 因为有关它的分离、结构以及其作用机制曾经是极端困难的问题。1926 年美国医生 G. N. Minot 和 W. P. Murphy 发现食物中加肝能治愈患恶性贫血的病人。由于此病不能在实验动物上产生, 只能用恶性贫血病人以测定肝提出物浓缩液的效价。故多年来虽屡次想分离出肝中因素仍仅取得很少进展。然而, 1948 年称为维生素 B<sub>12</sub> 的肝中因素的晶体终于由英国的 E. L. Smith 和美国的 E. Rickes 与 K. Folkers 等分离出来。

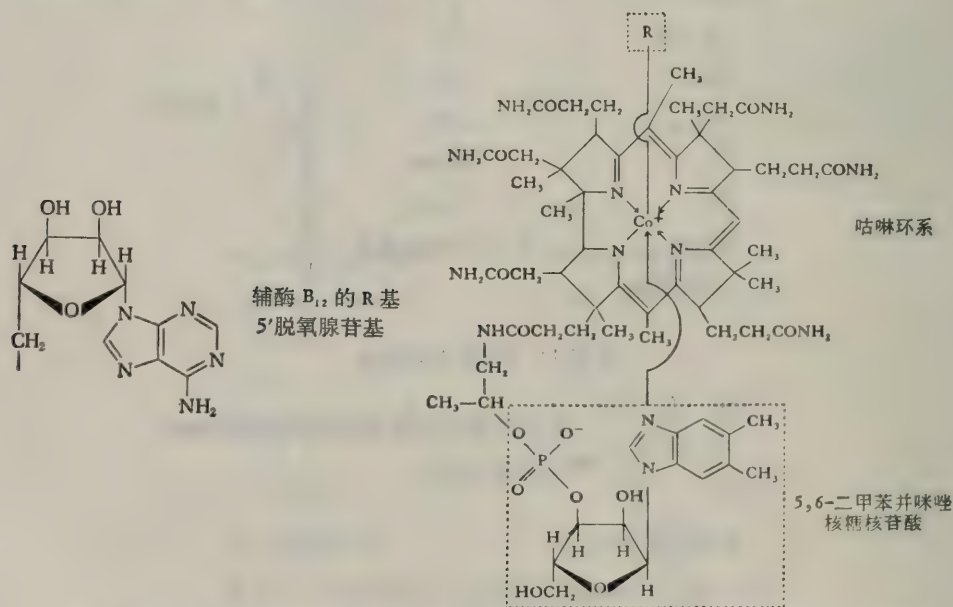


图 13-16 维生素 B<sub>12</sub> (钴胺素) 与其衍生物, 在氰钴胺素中 R = 氰化物。钴胺素也与 SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, OH<sup>-</sup> 和 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 等离子形成类似命名的络合物。在脱氧腺苷钴胺素(辅酶 B<sub>12</sub>) 中 R 即 5'-脱氧腺苷基(虚线方框)。

阐明维生素 B<sub>12</sub> 的结构(图 13-16) 确很困难, 但终于在 1957 年通过把化学方法和 X 光衍射方法结合起来得到了解决。维生素 B<sub>12</sub> 亦称氰钴胺素, 它有两种独特的组分。大的组分是咕啉环系, 它类似于血红蛋白的卟啉环系, 也含有四个吡咯型环, 但四个环中有一对五员环不是通过亚甲桥而是直接相连的。与咕啉环系内部四个氮原子配价相连的是一个钴原子, 早已知道钴是生长必需的。维生素 B<sub>12</sub> 的第二个重要组分是一种核糖核苷酸, 它的特点在于含有碱基叫 5,6-二甲基苯并咪唑以异乎寻常的  $\alpha$ -N 糖基键与 D-核糖相连接, 而不像大多数其它核苷酸那样具有  $\beta$ - 键。这个核糖核苷酸通过它的其它氮原子与钴原子之间形成配价键与咕啉相连, 也通过核糖核苷酸的 3'-磷酸根与咕啉环的一个支链之间形成酯键相连。氰占据钴原子上配位之一, 故称氰钴胺素。然而氰不过是分离过程出现的矫作物, 还知道有类似的络合物如: 与亚硝酸、亚硫酸和羟离子络合的产物。在辅酶 B<sub>12</sub> 中氰配体由 5-脱氧腺苷基(图 13-16) 所取代。还有另一形式的维生素 B<sub>12</sub>, 假维生素



B<sub>12</sub>，它也以辅酶出现，将在下面叙述。

无论动物或植物都不能合成维生素 B<sub>12</sub>，它只能由某些微生物制造。动物仅需极微量的维生素 B<sub>12</sub>。每毫升正常人血中只含维生素 B<sub>12</sub> 0.0002 微克。恶性贫血并非单纯由于食物中缺乏维生素 B<sub>12</sub> 产生的，而是因为患者胃液中没有一种称为内在因子的特殊糖蛋白，不能吸收来自食物中的维生素 B<sub>12</sub>。这种糖蛋白与一分子维生素 B<sub>12</sub> 结合，并将它带到肠细胞里，在这里 B<sub>12</sub> 又与另一种名为钴胺素传递蛋白质相结合，转移到周边组织里去。

维生素 B<sub>12</sub> 是红细胞正常成熟和生长所必需的。以前对它作用的分子基础不很清楚。1958 年当 H. A. Barker 发现污泥中厌氧的假破伤风梭状芽胞杆菌酶促谷氨酸转化成 β-甲基天冬氨酸时必需一种辅助因子，即假维生素 B<sub>12</sub> 的 5'-脱氧腺苷衍生物。假维生素 B<sub>12</sub> 分子内的核糖核苷含腺嘌呤而不含 5, 6-二甲基苯并咪唑。在破伤风梭状芽胞杆菌和其它某些不能制造 5, 6-二甲基苯并咪唑但能制造腺嘌呤的微生物中，都可发现这种维生素 B<sub>12</sub> 的变种。Barker 所发现的具有辅酶活性的假维生素 B<sub>12</sub> 的衍生物含有 5'-脱氧腺苷基作为钴原子的配体。假维生素 B<sub>12</sub> 与维生素 B<sub>12</sub> 的辅酶形式，每种都含有两个核苷酸部分：前者含有两个腺嘌呤核苷酸，后者则含一个苯并咪唑和一个腺嘌呤核苷酸，各以配位键与钴原子相结合。

辅酶 B<sub>12</sub> 或 5'-脱氧腺苷钴胺素是几种酶活性所必需的。需要辅酶 B<sub>12</sub> 的酶促反应都有一个共同特点：即一个氢原子从底物分子一个碳原子上作 1, 2 移动到邻近的碳原子上，通常还伴有其它基团如羟基、氨基、烷基或羧基等作相反方向的 2, 1 移动(图 13-17)。

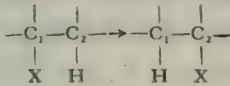


图 13-17 需要辅酶 B<sub>12</sub> 的酶所促进的  
氢原子在与 X 基交换时的 1, 2 互换。

这一作用的精确机制特别费解，至今仍未完全明白。然而，看来可能是辅酶 B<sub>12</sub> 与从底物分子上由酶脱下来的 H<sup>-</sup>负离子反应，其方式是 H<sup>-</sup>离子取代了 5'-脱氧腺苷基与钴原子连接部位上甲基的碳原子。然后伴随着要转移的其它基团的移动，H<sup>-</sup>离子便转移到底物的邻近碳原子上。在这种反应中钴原子大致保持 Co(II) 形式。辅酶 B<sub>12</sub> 的另一重要反应是使 5'-三磷酸核糖核苷的 2'-碳原子还原成相应的三磷酸 2'-脱氧核糖核苷。

在第二类以维生素 B<sub>12</sub> 为辅酶的酶促反应中，钴原子的第六个配价位是由甲基而不是 5'-脱氧腺苷基所填补，生成甲基钴胺素。在这些反应中甲基钴胺素起甲基载体作用，从 N<sup>5</sup> 甲基四氢叶酸转载甲基至某些受体分子，特别是同型半胱氨酸，后者经过甲基化变成蛋氨酸涉及维生素 B<sub>12</sub> 辅酶的酶促反应，将在后面更详细地叙述。

## 维 生 素 C

1932 年美国生化学家 C. G. King 和 W. A. Waugh 首先从柠檬汁中分离出维生素 C 或称抗坏血酸的纯结晶体。从结构上说它是最简单的维生素之一，是一种糖酸的内酯(图 13-18)。只有少数几种脊椎动物如人类、猿猴、豚鼠、印度的果蝙蝠和某些鱼类的食物必需含有维生素 C。某些昆虫和其它无脊椎动物也需要抗坏血酸，大多数其它高等动物和植物能从葡萄糖或其它简单前身物合成抗坏血酸。微生物中不存在抗坏血酸，看来也不需要它。

抗坏血酸是一种强还原剂，极易丧失氢原子变成脱氢抗坏血酸，而仍有维生素 C 活

性。然而当脱氢抗坏血酸的内酯环被水解而生成二酮古洛糖酸(图 13-18)时,即失去其维生素的活性。食物中抗坏血酸大部分在烹饪时遭到破坏。

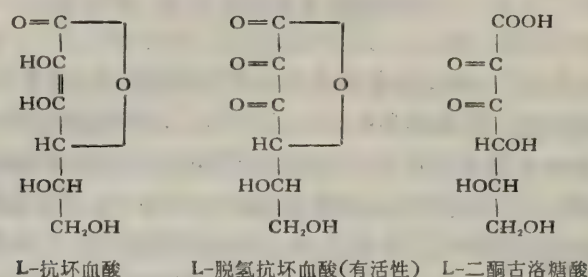


图 13-18 抗坏血酸与其衍生物

与其它水溶性维生素相比,动物和植物组织中抗坏血酸浓度颇高;例如人血浆每 100 毫升约含 1 毫克。柑桔类和番茄特别富于抗坏血酸。虽然要预防人类坏血病每日只需 20 毫克维生素 C 就够了,但有证据表明,要保证完全正常的生理机能和健康人们所需要的却远远超过上述数量。

尽管组织中抗坏血酸的浓度比较高,它的结构也颇简单,但它的生理功用却仍不知道。在脯氨酸变成羟脯氨酸的羟化过程中以及在其它羟化反应中它起辅助因子的作用,但它在这些反应中也并非特异的,而是可以用其它不具抗坏血病活性的还原剂所取代。

## 其它水溶性生长因素

除上述几种水溶性维生素之外,还有几种其它营养因素,但它们只在少数几种动物的食物中或是只在特殊情况下才是必需的。属于环状糖醇的肌醇(图 13-19)对于小鼠毛的正常生长以及大鼠“眼圈病”的防止是必需的。奇怪的是大鼠能毫不困难地从葡萄糖制造肌醇,但数量显然不够。肌醇不是任何已知辅酶的建造材料,但在动物组织里它却以肌醇磷酸甘油酯的组分相当大量地存在。

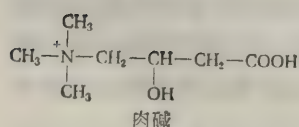
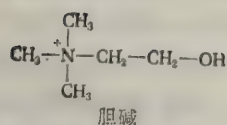
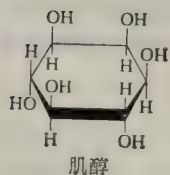


图 13-19 某些其它生长因素

胆碱(图 13-19)也是各种磷酸甘油酯类的组分之一,这里指胆碱磷酸甘油酯而言。虽然胆碱还没有已知的辅酶功用,但如果给予大鼠的氨基酸类——特别是蛋氨酸,(胆碱的前身物)不足时则饲料中必需有胆碱。胆碱不足会引起肝脏的脂肪浸润和肾出血。

对于哺乳动物肉碱不是必需的,因为它们能自己制造,但肉碱是大黄粉虫(*Tenebrio molitor*)所必需的生长因素。肌肉组织中特别富于肉碱。在脂酸的酶促氧化之前,肉碱是携带脂酸穿过线粒体膜的一种必需组分。



## 脂溶性维生素

四种脂溶性维生素 A、D、E、K 都是异戊二烯化合物。虽然对它们已深入地研究并广泛地运用于人类营养,但关于它们特殊生物功用我们知道的比水溶性维生素的少。迄今尚未发现任何脂溶性维生素具备特殊的辅酶功用,如果说对它们作用的分子基础略有了解也只限于维生素 A 和 D。

### 维 生 素 A

常见的维生素 A 有两种形式:维生素 A<sub>1</sub>,或视黄醇(图 13-20),最常见于哺乳类组织和海产鱼类中;以及维生素 A<sub>2</sub>,或视黄醇<sub>2</sub>,常见于淡水鱼类。两者都是含有一个六碳环和一个十一碳侧链的异戊二烯化合物。在动物组织中具有维生素 A 活性的不仅是视黄醇,还有广泛存在于植物界的某些类胡萝卜素,特别是  $\alpha$ -、 $\beta$ - 和  $\gamma$ -胡萝卜素。胡萝卜素本身并无固有的维生素 A 活性,但在肠粘膜和肝中通过酶促反应能转变成维生素 A。 $\beta$ -胡萝卜素是个对称的分子,从其中央切断可产生两个分子视黄醇(图 13-20)。视黄醇存在于哺乳类组织中以长链脂酸酯的形式在血中运输。

维生素 A 缺乏症首先是在大鼠身上发现的,但所有哺乳类包括人在内似乎都有敏感性,且其症状又大同小异。幼小动物缺乏维生素 A 时生长受阻、骨骼和神经系统发育也不正常、皮肤干燥变厚,肾和各种腺体退化,而且不论雌或雄性都成为不育。虽然所有组织似乎都会因维生素 A 的不足而受到干扰,但以眼睛所受影响最为明显。婴儿和幼童的干眼病是缺乏的早期症状,也是某些营养情况普遍不良的热带地区盲症的常见原因。成年人的缺乏早期微兆是夜盲症,即暗适应缺陷,诊断时常使用暗适应试验。幼小动物最易患维生素 A 缺乏症。因为肝脏能储存足以维持几个月甚至几年之久的维生素 A,故成年动物不易产生缺乏症。

人类对维生素 A 的需要量每天不到一毫克,主要由生菜、菠菜、甜薯和胡萝卜等绿色和黄色蔬菜提供;它们都富于胡萝卜素。鱼肝油特别富于维生素 A。然而,过多摄取维生素 A 有毒性,能引起儿童骨脆易骨折以及胚胎发育不正常。

虽然我们还不知道维生素 A 更广义的生物功能,但维生素 A 在脊椎动物视循环中所起作用的详情则已具备。其分子活动的程序包括(1)通过视网膜内光受体细胞的色素吸收光能,产生一种特殊的光化学产物;(2)光产物引起神经冲动及(3)视色素对光敏感的形式的再生作用。(图 13-21)

人类视网膜和其它哺乳类的一样,含有两类对光敏感的光受体细胞。杆状细胞适合于感受弱光,但对颜色不敏感;它们是与夜间视觉有关的,缺乏维生素 A 时这一功能就受阻。椎状细胞对颜色敏感,适合于强光。杆状细胞里的视循环已深入研究,特别是由于有哈佛大学 G. Wald 的研究,我们才知道维生素 A 在这一功能里的梗概。

视网膜杆状细胞含有许多重叠的膜状泡囊,它们与视网膜的受光表面平行,作为光的受体。这些泡囊的膜中蛋白质的一半左右是能吸收光的结合蛋白质视紫红组成的(以前称视紫质),它的分子量约为 28,000。视紫红不溶于水但能用去污剂从泡囊中提取。纯化

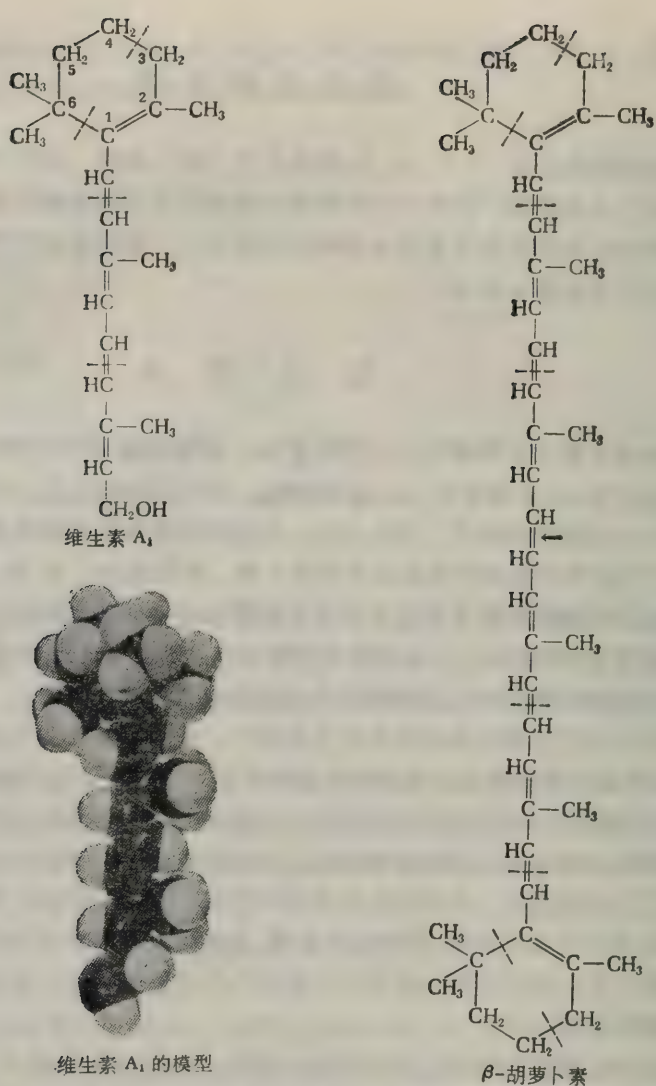


图 13-20 维生素 A<sub>1</sub> (视黄醇) 及 β-胡萝卜素, 它的前身物。氧化裂解(箭头)得两分子维生素 A<sub>1</sub>。用虚线分离异戊间二烯单位。维生素 A<sub>2</sub> 在环中第 3 与第 4 碳原子之间有第二个双键; 否则它与维生素 A<sub>1</sub> 相同。

后的视紫红在可见光范围内的吸收光谱与眼睛在暗光下的光敏感度曲线颇相类似, 表明视紫红是杆状细胞的主要光受体。视紫红是由一种称为视蛋白的蛋白质与一种称为 11-顺-视黄醛的维生素 A 醛紧密结合构成的。维生素 A 醛的侧链上四个碳与碳之间的双键, 其中有三个是反式, 而第四个在 11, 12-位置上的是顺式(图 13-22)。回忆起来大多数异戊二烯化合物上的双键都是反式的。当视紫红暴露在光下时, 结合在其上的 11-顺视黄醛转化成为全反视黄醛, 引起视黄醛分子构形的深刻变化(图 13-22)。这一反应不是酶促的, 它是在液态氮温度下进行的纯光化学反应。继视黄醛的异构化作用之后, 还发生了一系列其它分子变化, 最后, 漂白了的视紫红离解成为游离视蛋白和全反视黄醛, 起了触发神经冲动的开关作用。(见后)

若要使视蛋白和全反视黄醛重新生成视紫红, 全反视黄醛必须经过异构化, 变回成为



11-顺视黄醛。这一过程似乎需要经过由两种酶所催化的一系列酶促反应才能完成:

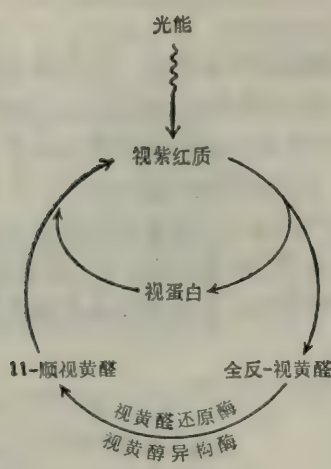


图 13-21 棒状细胞内的视循环

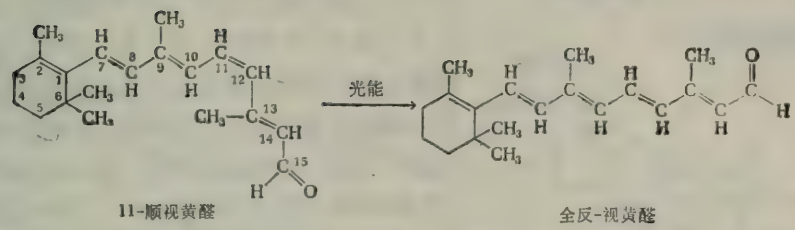
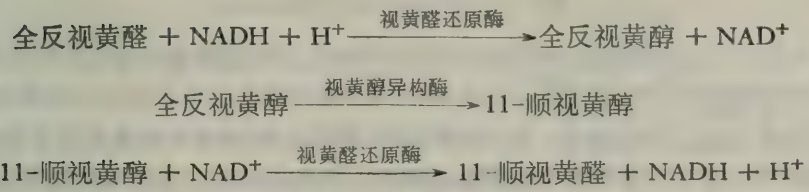


图 13-22 11-顺视黄醛的光诱发的异构化作用



11-顺视黄醛形成后与视蛋白再结合产生视紫红,视循环就此完成。

视循环中关键的问题在于视紫红的漂白引起视网膜内神经冲动的机制,因此而使大脑真实地感受到光刺激。最近的研究表明杆状细胞中盘状扁平泡囊吸收光线时,伴随着11-顺视黄醛转变成全反-视黄醛,引起视紫红分子构形变化。这一变化改变了泡囊膜的通透性,平时此膜有跨膜电位差,允许Ca<sup>2+</sup>离子从泡囊中流出,激发神经冲动。正如Ca<sup>2+</sup>将兴奋的神经冲动与肌肉收缩系统偶联起来那样,在将兴奋刺激与受体系统的功能偶联起来的时候Ca<sup>2+</sup>离子作为信使或者中介物。

由于维生素A缺乏不单是影响视网膜而且影响哺乳类所有各种组织,故视黄醛在视循环中的功用不能代表维生素A的全部作用。维生素A的广泛功能看来类似于它在杆状细胞内的功用,在于运输Ca<sup>2+</sup>离子穿过某些膜;这种更广泛的功用也许可以用来解释维生素A缺乏或过多对于骨质和结缔组织所发生的影响。

## 维 生 素 D

很早就知道佝偻病是正在成长中骨骼的一种疾病,能引起弓形腿和鸡胸。在冬季长、光照少的地区儿童中常见此病,而用鱼肝油则能防止佝偻病症状。这些线索导致几种具有维生素D或潜在有维生素D活性的化合物的分离和鉴定。其中最重要的是维生素D<sub>2</sub>或麦角钙化固醇,与维生素D<sub>3</sub>或胆钙固醇(图13-23);后者是正常情况下哺乳动物含有的维生素D。这些化合物可看作是B环已被破坏的类固醇。由于用紫外线照射某些食物也能产生具有维生素D活性的物质,在寻找维生素D前身物时证明动物组织里常有的7-脱氢胆固醇经过照射转变成胆钙固醇。同样酵母里的麦角固醇经过照射转变成麦角钙化固醇

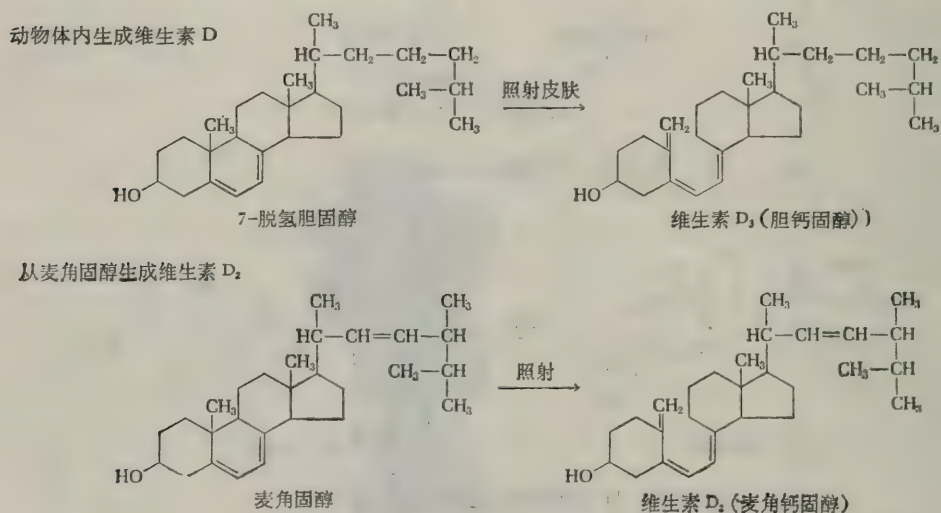


图 13-23 维生素D从它的前身物形成

醇(图13-23)。从这些发现中得知7-脱氢胆固醇是人类皮肤里胆钙固醇的天然前身物,它的转化作用需要日光照射皮肤。这就是人们在正常情况下没有向饮食中添加维生素D时获得这种维生素的主要途径。绝大多数天然食物里,即令含有维生素D为量也不多;食物中现成的维生素D主要来源于鱼肝油或照射过的天然食物。商品维生素D制剂,是用紫外线照射酵母中来的麦角固醇的产物。成人每日约需要维生素D 20 微克。肝能从一次剂量中摄取足以维持几个星期的维生素D储存在肝中。正如维生素A一样,服用过量维生素D会引起骨骼变脆,易产生多发性骨折,这表明两种维生素在钙的生物运输和沉积方面都起作用。

虽然久已知道维生素D与骨骼的正常钙化有关,但其特有的生化功用,直到最近从研究工作,特别是从 H. F. DeLuca 与其同事所作的研究中才得到结果。最初的重要线索来自于用合成制备且比活性高的放射性胆钙固醇对代谢过程所做的研究,以微量注射也能在动物体内有生理活性。在血液和组织里出现一种胆钙固醇的标记衍生物,即 25-羟胆钙固醇(图13-24)。这一产物的生物活性比胆钙固醇的活性更高,并且此后发现它是动物体内维生素D的主要循环形式,在肝中生成。DeLuca 与其同事后又具有放射性的 25-羟胆钙固醇注射到动物体内,发现它进一步代谢成为 1, 25-二羟胆钙固醇(图13-24)。



这个化合物的活性更强;给与后对  $\text{Ca}^{2+}$  在小肠内的吸收产生迅速的激活作用。E. Kodicek 进一步的实验证明,肾脏是 1, 25-二羟胆钙固醇生成的地点,这后者似乎是维生素 D 具有生物活性的形式,它能直接作用于其主要靶组织小肠和骨骼。

按照经典的定义激素是一种化学信使,由某一器官或腺体所产生并由血液转送到某些特定组织在那里产生它的调节功能,DeLuca 曾认为 1, 25-二羟胆钙固醇实际上是一种激素。1, 25-二羟胆钙固醇正是在肾内生成并由血液运到它的靶组织小肠和骨骼。它与其它激素不同之处仅在于,如果动物不能转化内源性 7-羟基胆固醇为胆钙固醇,则必需由食物提供它的前身物。

另一研究表明 1,25-二羟胆钙固醇促进  $\text{Ca}^{2+}$  从肠吸收入血,是通过它能促进参与肠粘膜中  $\text{Ca}^{2+}$  转移或结合的一种或几种特殊蛋白质的生物合成。1, 25-二羟胆钙固醇这一功用是与甲状旁腺激素的作用相整合的。每当血中  $\text{Ca}^{2+}$  浓度下降到低于正常时,甲状旁腺分泌出大量甲状旁腺激素,它是一个具有 84 个氨基酸残基的多肽,这激素作用于肾,促进它排出更多磷酸到尿中,而且从前身物 25-羟胆钙固醇制造出更多 1, 25-二羟胆钙固醇。因此甲状旁腺激素可能是一种 1, 25-二羟胆钙固醇的促激素;促激素是促进另一种激素的合成或分泌的激素。图 13-25 总结了这些关系。

### 维 生 素 E

单独用牛乳饲养大的大鼠不能生育,维生素 E 最初是作为植物油中能使这些大鼠重新生育的一种因素而被认识的。它是从麦芽分离出来的并命名为生育醇 (Tocopherol, 希腊文 tokos 的意思是“生孩子”)。现已在植物里发现几种具有维生素 E 活性的不同生育醇,其中  $\alpha$ -生育醇的活性最高而且也最丰富。(图 13-26)

维生素 E 的生物学意义尚未弄清。原因之一是缺乏生育醇时雌的和雄的大鼠除了不能生育之外还产生诸如肾退化,脂库中沉积褐色素,肝坏死,骨骼肌萎缩或消瘦(特别是草食动物如豚鼠)等多种症状。至于人类缺乏生育醇时是否会引起不育症,目前还不清楚。

已发现生育醇有抗氧化活性;即当高度未饱和的脂酸与分子氧接触时生育醇能防止脂酸的自动氧化。这种自动氧化导致未饱和脂酸的聚合作用。这和油漆里因亚麻子油“干固”而变成又硬又坚,不能溶解的聚合物的过程相似。实际上,动物缺乏生育醇时的某些症状能用其它具有抗氧化活性的化合物加以防止,其中有些化合物如 N, N-二甲基-P-苯二胺等,与生育醇在结构上并无明显关系,而且不存在于生物界。生育醇的功用之一可

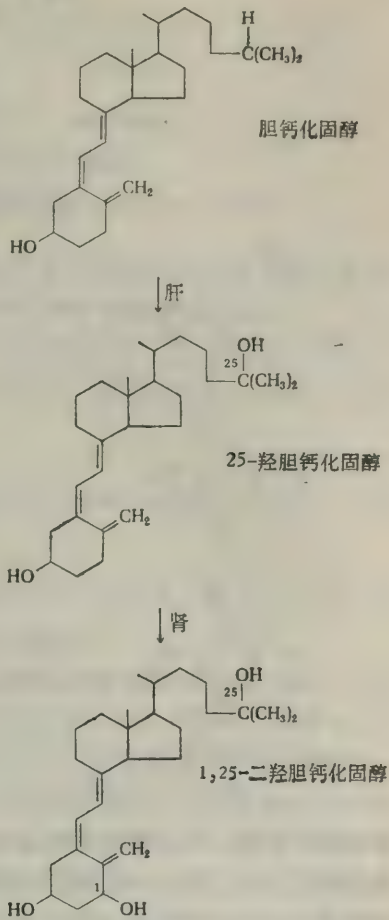


图 13-24 胆钙固醇(维生素  $\text{D}_2$ ) 转化成 25-羟胆钙固醇,然后再转化成有活性的 1, 25-二羟胆钙固醇。

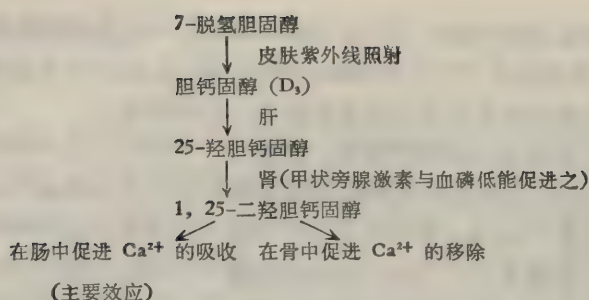


图 13-25 维生素 D<sub>3</sub> 的前身物, 代谢与功能

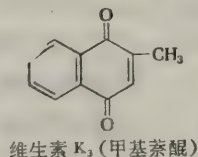
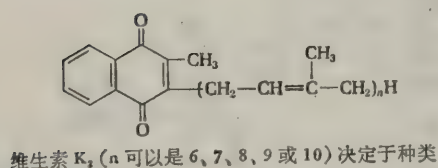
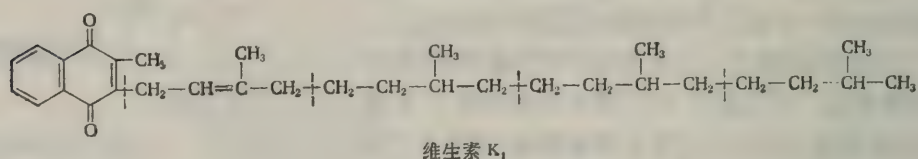
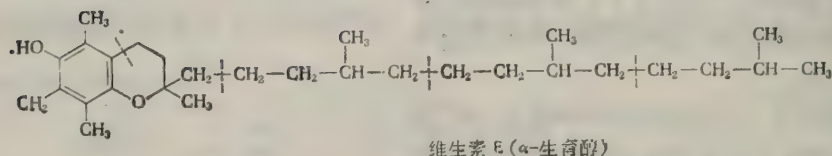


图 13-26 维生素 E 与维生素 K 都是异戊二烯类似物; 异戊二烯单位用虚线区分。

能是使生物膜中脂类所含高度未饱和脂酸免受分子氧的破坏。正常组织中没有未饱和脂酸自动氧化的产物, 但在缺乏生育醇时能在脂库、肝和其它器官中检验出来。然而上述功能并不像是生育醇唯一的生物学作用, 辅酶 Q 和它的某些衍生物也有类似生育醇的活性。

## 维 生 素 K

维生素 K (K 代表丹麦文“凝固”) 首先由丹麦人 H. Dam 发现, 在用一种能产生出血倾向的食物饲养小鸡时, 它是维持正常凝血时间所必需的营养因素。1939 年美国 E. A. Doisy 与其同事分离出维生素 K 并确定了它的结构。已知维生素 K 至少有两种形式 (图 13-26); 维生素 K<sub>1</sub> 被认为是具有活性的形式。2-甲基萘醌, 或称维生素 K<sub>3</sub>, 则是缺少一条长侧链的合成产物。由于肠道细菌能够合成这种维生素, 大鼠和其它哺乳动物不易产生维生素 K 缺乏症。

维生素 K 缺乏的唯一已知结果是肝中称为转变加速因子前体的酶的生物合成障碍。此酶催化涉及凝血酶原生成一系列复杂反应中的一个步骤。凝血酶原是凝血酶的前身物, 后者是加速纤维蛋白原转变成纤维蛋白的一种蛋白质, 而纤维蛋白又是构成血凝块中



纤维部分的不溶性蛋白质。双香豆素是维生素K的类似物(图 13-27),能使动物产生类似维生素K缺乏的症状;据信这是因为它阻断了维生素K的作用。临床上常用双香豆素以防止血管内的凝固作用。

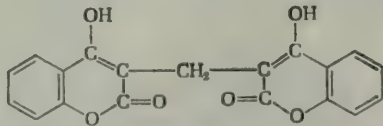


图 13-27 双香豆素[3, 3'-甲叉两个(4羟, 1, 2-苯并吡喃酮)]——维生素K的一种对抗物

由于很多微生物和大多数植物能产生维生素K,而且所有生物的各组织里都有它的存在,因而发生了这样的疑问,即除作为血液凝固中一个因子外它是否还有其它更广泛的生物活性。有某些证据表明动物组织内电子转移的一种特殊途径中,维生素K可能起一种辅酶的作用;这是由于它是一种醌,能可逆地还原成苯酚,故它可能起电子载体的作用。

### 摘 要

维生素是大多数生物维持其功能所必需的微量有机物质,但有些生物自己不能合成它们而必需来自外界。它们可分为水溶性的和脂溶性的两大类。

大多数水溶性维生素是以中心代谢途径中各种重要辅酶的必需建造组分而起作用的。人类缺乏硫胺素(维生素B<sub>1</sub>)就引起脚气病,硫胺素是硫胺素焦磷酸的活性成分,后者又是α-酮酸酶促脱羧反应的必需辅酶。核黄素(维生素B<sub>2</sub>)是黄素单核苷酸(FMN),和黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)等辅酶的组分之一,这两种核苷酸是作为某些氧化酶类的载氢辅基而起作用的。烟酸,缺乏它时会引起癞皮病,是烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD与NADP)的一个组分,NAD与NADP是与吡啶连接的脱氢酶的电子传递体。泛酸是辅酶A的必需组分,在脂酸的酶促氧化和合成过程中,辅酶A作为酰基载体而起作用。维生素B<sub>6</sub>(吡哆醇)是辅酶磷酸吡哆醛的必需前身体,这一辅酶是转氨酶的辅基或是其它氨基酸转化酶类的辅基。生物素作为某些羧化酶的辅基而起作用;它是二氧化碳的载体。叶酸是四氢叶酸的前身体,后者常在某些一碳化合物酶促转移中起辅酶作用。硫辛酸在α-酮酸氧化脱羧作用中作为氢原子和酰基的载体。维生素B<sub>12</sub>或氰钴素在大多数高等生物的营养中是必需的,它有一个复杂的咕啉环系统。它的5'-脱氧腺苷基衍生物称为辅酶B<sub>12</sub>,在两个邻近碳原子之间氢原子1,2的酶促催化转移中起辅酶作用。甲基钴胺素则在许多甲基移换反应中起作用。

脂溶性维生素似乎不起辅酶组分的作用而起其它重要的作用。维生素A的前身体是β-胡萝卜素,在脊椎动物杆状细胞的视循环中它以一种对光敏感的受体色素而起作用。维生素D是从照射7-脱氢胆固醇而形成的类固醇衍生物,它是1,25-二羟胆钙固醇的主要生物前身体,在肠道与骨骼中后者有激励钙结合和钙运输等类似激素的作用。食物中缺乏维生素E或生育醇可使脊椎动物产生各种症状。维生素K是带有异戊二烯侧链的一种醌,除与凝血机制的组分生物合成有关以外,可能还有其它功用。

## 参 考 文 献

### 书籍

- Blakley, R. L.: *The Biochemistry of Folic Acid and Related Pteridines*. North-Holland, Amsterdam, 1969.
- Deluca, H. F., and J. W. Suttie (eds.): *The Fat-Soluble Vitamins*, University of Wisconsin Press, Madison, 1970.
- Dyke, S. F.: *The Chemistry of the Vitamins*, Interscience, New York, 1965.
- Florkin, M., and E. H. Stotz (eds.): *Metabolism of Vitamins and Trace Elements*, vol. 2 of *Comprehensive Biochemistry*, Elsevier, Amsterdam, 1970. Detailed reviews, with much valuable background.
- Hutchinson, D. W.: *Nucleotides and Coenzymes*, Wiley, New York, 1964.
- Sebrell, W. H., Jr., and R. S. Harris, (eds.): *The Vitamins*, 2d ed., vols. 1—5, Academic, New York, 1967—1972. Important reference work.
- Smith, E. L.: *Vitamin B<sub>12</sub>*, Wiley, New York, 1965.
- Wagner, A. F., and K. Folkers: *Vitamins and Coenzymes*, Interscience, New York, 1964.

### 论文

- Barker, H. A.: "Corrinoid-Dependent Enzymic Reactions," *Ann. Rev. Biochem.*, 41: 55—90 (1972).
- Burns, J. J.: "Ascorbic Acid," pp. 394—411, in D. M. Greenberg (ed.), *Metabolic Pathways*, 3d ed., Academic, New York, 1967.
- Chatterjee, I. B.: "Evolution and the Biosynthesis of Ascorbic Acid," *Science*, 182: 1271—1272 (1973).
- Knappe, J.: "Mechanism of Biotin Action," *Ann. Rev. Biochem.*, 39: 757 (1970).
- Wasserman, R. H., and A. N. Taylor: "Metabolic Roles of Fat-Soluble Vitamins D, E, and K," *Ann. Rev. Biochem.*, 41: 179 (1972).

[任邦哲译 简士廉校]



## 第Ⅱ篇 分解代谢与磷酸键能的产生



0.5 微米

梯牧草叶绿体薄切片



## 第十四章 代谢途径与能量转移途径：中间代谢概貌

“中间代谢”常常被简要地描述为细胞内所有酶促反应的总称。这种说法虽无不确切之处，但作为定义则不够完善，因为它未能说明代谢是高度有组织和有意义的活动，其中有许多相互关连的多酶体系参与，以进行细胞内外物质和能量的交换。代谢有四种特殊功用：(1) 自“燃料”分子或被吸收的日光获得化学能；(2) 将外源性的养料转化成细胞大分子的结构单位或前体；(3) 将建造原料合成蛋白质、核酸、脂类和其他细胞成分；(4) 合成或降解在细胞特殊功能中所需要的生物分子。

虽然，代谢包括数百个不同的酶促反应，我们常把它绘成非常详尽的代谢图表，给人以极其错综复杂的印象，但实际上中心代谢途径的形式和作用并非难于理解的。而且大多数生命体内的中心代谢途径都十分相似。

本章我们将概述细胞生命所需的营养物质和能量的来源、细胞组分合成和降解的主要途径、细胞能量转换的途径，以及研究细胞代谢的实验手段等等。

### 细胞生活所需的碳源和能源

根据细胞从周围环境摄取碳的化学形式，可将细胞分为两大类。自养细胞 (autotrophic cells) 是以二氧化碳为唯一碳源，并以此合成它们全部有机生物分子的碳骨架。异养细胞 (heterotrophic cells) 则不能利用二氧化碳，而必须从环境中摄取较复杂的还原型物质 (如葡萄糖) 为碳源。所以自养生物相对地自给自足，而异养生物所需的碳源则是一种较特殊的形式，必定是其他细胞合成的产物。有光合作用的细胞和某些细菌属自养型，而高等动物和大多数微生物则是异养型。

第二种分类法是根据细胞的能源。以光为能源的是光型 (phototrophs)，以氧化还原反应为能源的是化学型 (chemotrophs)。化学型又可按其氧化获能时电子供体的性质分类。所谓氧化还原反应是指电子由电子供体 (还原剂) 转移给电子受体 (氧化剂) 的反应。凡要求以复杂的有机分子如葡萄糖为电子供体的生物称为化学有机型 (chemoorganotrophs)。凡生物利用简单的无机物如：氢、硫化氢、氨或硫为电子供体的称为化学无机型 (chemolithotrophs) (希腊文 litho 是石头的意思)。表 14-1 表明，根据能量和碳的来源，可将所有的生物分为四种主要类型：化学有机型、化学无机型、光有机型 (photo-organotrophs) 和光无机型 (photolithotrophs)。

绝大多数有机体不是光无机型就是化学有机型。虽然属于另两型的种属相对较少，但也不是十分稀有。其中有一些在生物界起着极重要的作用，特别是那些能固定分子氮或者将氨氧化成硝酸盐的土壤微生物。还必须注意到，地球上差不多半数的生命是微生物，而大多数微生物又生存在土壤和海洋之中。

异养生物可分为两大类，需氧类，以分子氧为最终的电子受体 (电子来自有机的电子供体)；厌氧类，利用其他分子代替氧作为电子受体。许多细胞不论有氧无氧都能生存，它



表 14-1 生物的代谢分型

生物分型	碳 源	能 源	电子供体	举 例
光无机型	CO <sub>2</sub>	光	无机化合物: H <sub>2</sub> O、H <sub>2</sub> S、S	高等植物的绿细胞(在光中)、蓝藻、具有光合作用的细菌。
光有机型	有机化合物	光	有机化合物	不需硫紫色细菌
化学无机型	CO <sub>2</sub>	氧化还原反应	无机化合物: H <sub>2</sub> 、S、H <sub>2</sub> S、Fe(II) NH <sub>3</sub>	氢、硫、铁和脱氮细菌
化学有机型	有机化合物	氧化还原反应	有机化合物: 葡萄糖	所有的高等动物、大多数微生物、无光合作用的植物细胞、在黑暗中的光合细胞。

们被称为兼性生物。有氧时,它们利用氧,无氧时,它们则能利用某些有机物作为电子受体。那些完全不能利用氧的生物叫做严格厌氧菌;事实上许多严格厌氧菌可以为氧所毒害。大多数异养细胞,特别在高等生物,是兼性的,而且只要能获得氧,那么它们就优先用氧,因为这样可以更经济地利用燃料分子。

必须注意到,并非一种生物所有的细胞都属同一类型,有些类型的细胞具有很大的代谢可塑性。例如,高等植物叶子中绿色的含叶绿素细胞是具光合能力的自养型,而根部细胞却是异养型。此外,多数绿叶细胞在日光中的作用如同光合自养型,而在黑暗中则如同异养型。

## 碳 和 氧 循 环

自然界活机体在营养上从多方面相互依存。生物界的碳氧循环是最基本的,光合细胞和需氧的异养细胞彼此相互供养着,这种关系称之为共养 (syntrophy)。光合细胞可消耗太阳能,从大气中的 CO<sub>2</sub> 和水合成有机物,如葡萄糖。异养细胞则利用光合细胞产生的有机物为燃料及建筑材料;它们所生成的代谢终产物 CO<sub>2</sub> 被释回大气中,并且重新被光合细胞利用(图 14-1)。在光合和异养生物之间,伴随着碳的循环还进行氧的交换(图 14-1)。多数光合生物是产生氧的,氧又回过头来被异养生物作为氧化燃料。生物界碳循环量极大,据统计,每年周转的二氧化碳达  $3.5 \times 10^{11}$  吨。

自然界活机体之间在营养上的相互依存(这里,以碳循环为例),常发生于生物界的多种水平,即从上述的宏观水平到微观水平;它是一切生态体系的特征。

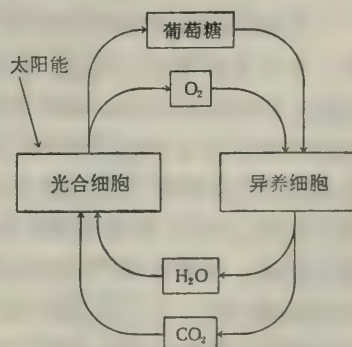


图 14-1 生物界的碳氧循环

## 氮 循 环

氮——蛋白质、核酸和其他重要生物分子的组成元素,也是通过生物界活机体进行循环的。正和碳循环一样,我们发现它在不同类型的生物中,在营养和代谢上也是相互依存

的。虽然大气中分子氮 ( $N_2$ ) 含量很大,但是相对而言,它具化学惰性,不为大多数活机体所利用。大多数活机体是从某些化合物的形式,如硝酸盐、氨,或更复杂的化合物,如氨基酸

等,获取氮的。然而这种结合型的氮在地面水和土壤中毕竟含得很少,而且它们在不断地转换着(图 14-2)。多数植物所摄取的氮是来自土壤硝酸盐,这些硝酸盐还原成氨、氨基酸及其他还原产物。这些物质是构成含氮细胞组成,如蛋白质的原料。于是异养生物利用植物蛋白为养料,并且以排泄终产物或是它们死后腐败产物,一般以  $NH_3$  的形式将氮释回土壤。土壤微生物又氧化  $NH_3$ ,生成亚硝酸盐和硝酸盐,这些盐类可以被植物反复利用。只有少数生命,如固氮菌,能还原大气中的  $N_2$ ,并且因此给生物界补充了生物学上可利用的化合氮。

已知最能自给的细胞是固氮光合蓝藻,它们是土壤、新鲜水及海洋中发现的原核生物。

它们从日光中获取能量;从  $CO_2$  获得碳;从大气氮中获得氮;它们用来还原  $CO_2$  的电子来自水。蓝藻被认为是在进化中移居大陆的第一代微生物,这一学说在若干年前被一有趣的观察所证实: 1883 年喀拉喀托山 (Mount Krakatoa) 火山爆发后,一大片环绕着的海洋中的一切生命遭到完全毁灭,但重新出现的第一代微生物却是固氮蓝藻。

## 生物界的能量流动

生物界有巨大的能量流动,大多与碳循环相偶联。光合生物攫取太阳能,并将它转化成葡萄糖或其他有机物的化学能。异养生物利用这些产物作为它们结构生物分子的前体和作为富含能量的燃料,以完成它们的需能活动(图 14-3)。所以差不多所有的生物,不论它们是自养还是异养,其最终能源都是太阳能。然而重要的是应该注意到,在生物界能量是不循环的,而只单向流动。这种流动开始于光合细胞对太阳能的攫取和将它转化成光合产物的化学能。这些产物再为异养生物所利用,以完成细胞的各种形式的功能。在这些过程中,化学能分解成生物学无用的能量形式,如热能,然后散失在周围环境中。

在生物界,能的流动量是巨大的。每年约有  $10^{19}$  千卡太阳能被生物界的光合机体利用,将二氧化碳转化成生物物质。生物学能量约二十倍于地面上流经全部人造机器的能

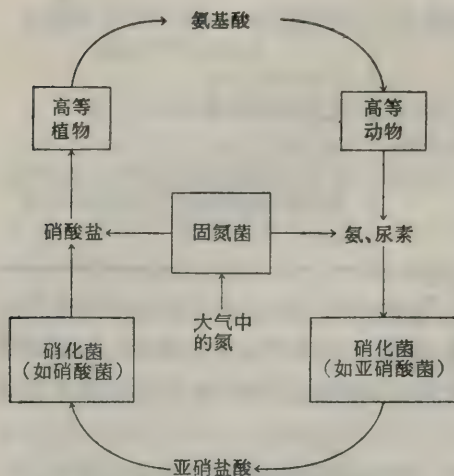


图 14-2 氮循环

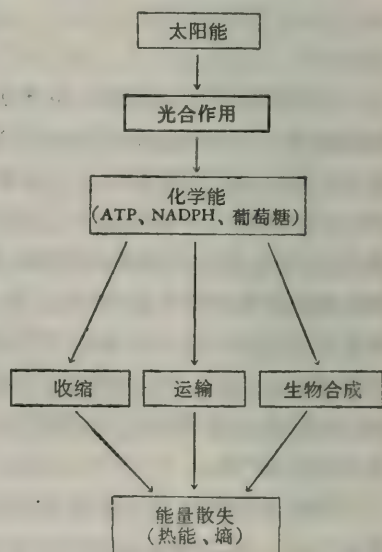


图 14-3 生物界的能量流动。太阳能是所有细胞能量的来源。动植物都利用葡萄糖和其他光合产物供给能量,以保证生活细胞的活动,太阳能最终成为无用的形式(如热能)散失。



量。

机体和细胞在营养上的相互依存

许多生物除了需要糖和脂类那样一些主要营养物之外，还要求一些由别的生物合成的特殊有机物质。虽然，大肠杆菌能利用氨作为制造它所需的全部氨基酸、核苷酸和其他含氮组分的唯一氮源，但生成乳酸的细菌——产乳酸需氧链球菌 (*Leuconostoc mesenteroides*) 却总共需要 32 种不同的含氮养料，包括大部分普通氨基酸以及许多维生素。(表 14-2)

表 14-2 产乳酸需氧链球菌的营养需要

葡萄糖					吡哆醇
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>					泛酸
氨基酸					核黄素
Ala	Glu	Lys	Thr		菸酸
Arg	Gly	Met	Trp		对-氨基苯甲酸
Asn	His	Phe	Tyr		生物素
Asp	Ile	Pro	Val		叶酸
Cys	Leu	Ser			Na <sup>+</sup>
碱					K <sup>+</sup>
腺嘌呤					Mg <sup>2+</sup>
鸟嘌呤					HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>
尿嘧啶					SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>
黄嘌呤					Fe <sup>2+</sup>
维生素					Mn <sup>2+</sup>
硫胺素					

表 14-3 大白鼠所需的有机养料

氨基酸		菸酸
精氨酸		泛酸
组氨酸		吡哆醇
异亮氨酸		生物素
亮氨酸		维生素 B <sub>12</sub>
赖氨酸		叶酸
甲硫氨酸		脂溶性的
苯丙氨酸		维生素 A
苏氨酸		维生素 D
色氨酸		维生素 E
缬氨酸		维生素 K
维生素		其它有机化合物
水溶性的		多烯脂肪酸
硫胺素		胆碱
核黄素		肌醇

许多脊椎动物，包括人类，都缺乏合成某些氨基酸的能力，因此必须从食物供给这些氨基酸，这些氨基酸被称为必需氨基酸。此外，还有许多微生物和动物，缺乏合成某一种

或多种维生素的能力,也必须从外界摄取。大白鼠的营养需要可能和人的相同,见表 14-3。共养作为生态系统的一种组织原则,已超出碳和氮的大量交换的范围;不同种属的机体间,在代谢上相互依存的关系还表现在一些高度专一的微量有机分子方面。

甚至在某一个多细胞机体内,一种类型的细胞常依赖于另一型细胞的代谢产物。其实这种营养上的相互依存是多细胞生物进化中的一条组织原则。一般来说,高等动物的细胞常需许多外源性物质维持生长。实际上,在体外培养哺乳类细胞需要哪些复合性养料还不清楚。

## 中间代谢的灵活性和经济利用

活机体具有相当大的代谢灵活性,能适应从环境获取的各种养料的质和量。例如,所有的大肠杆菌细胞都是化学有机型,但即使在这一类型内,它们的代谢也是多种多样的。它们不仅可利用葡萄糖作为其单一的碳源,而且还可利用其他糖类、甘油、氨基酸类、乙醇、甚或乙酸。这种灵活性之所以可能,是因为所有这些碳源都可被大肠杆菌细胞内的酶转化成为能进入中心代谢途径的燃料。

除氨以外,大肠杆菌还能利用其他氮源,如氨基酸类、嘧啶类、胆碱及其他含氮化合物。实际上,如果大肠杆菌的培养基不是只含氨,而是供给足以合成其蛋白质和核酸所需的各种氨基酸、嘌呤、嘧啶的完善混合物,那么大肠杆菌的生长就快得多。在这样的环境内,大肠杆菌细胞可省去从氨来制造所有这些建筑材料的工作。也确实这样,当那些只给氨作为氮源的大肠杆菌,一旦有了丰富的外源氨基酸供应,它们就停止利用氨,而用现成的氨基酸代替。由于有现成氨基酸可利用,就如同发出讯号一样,停止氨基酸合成所需酶的生物合成,因此细胞也不必再从事制造这些现已成为多余的酶的代谢工作。然而如果环境中现成氨基酸的浓度降至临界水平以下,那么又得重新合成那些必要的酶,细胞又开始以氨为氮源生产它自己的氨基酸。以后我们还会反复看到,细胞在利用能量和养料上遵循最经济的原则的例子,它通过各种类型的调节系统使之实现。

## 分解代谢和合成代谢

代谢可分为两个主要方面,分解代谢和合成代谢。分解代谢是代谢的降解方面,那些相对大些和复杂些的养料分子(糖、脂类和蛋白质),不论是来自细胞周围环境还是细胞自身的养料贮存库,都被降解生成较小和较简单的分子,如:乳酸、乙酸、 $\text{CO}_2$ 、氨或尿素。分解代谢常伴随使本来蕴藏在有机养料分子结构中的化学能释放,并以能量转移分子三磷酸腺苷(ATP)的形式贮存起来。

合成代谢是代谢的建造或生物合成方面,从一些简单的建筑材料前体酶促合成细胞的分子组分,如核酸、蛋白质、多糖和脂类。从简单的前体生物合成有机分子时需要化学能,此能由分解代谢产生的 ATP 来供给。细胞内分解代谢和合成代谢既相互关连又同时发生,但是正如我们将要讨论的,它们的调节却互不相干。由于代谢是经过许多中间产物逐步进行,所以常用“中间代谢”这个名词来表明代谢的化学途径,而代谢的中间产物叫代谢物。



伴随着代谢的每一步酶促反应都有特征性的能量变化。在分解代谢途径中一些特殊的步骤,代谢物的化学能以 ATP 形式贮存,而在生物合成过程的某些步骤,ATP 的能量则被利用。因此,当我们研究任何一个代谢途径时,不仅必须考虑到前体分子的共价结构转化成终产物的连续酶反应,而且还必须考虑代谢转化时贮存或消耗能量的化学机制。

以后将讨论到,每一分解和合成途径都是由一系列连续的酶促反应组成,有时甚至多到廿个步骤。也许有人会问,几步或仅仅一步时是否就不能形成终产物。可以这样回答,多个连续步骤比参与代谢联系的单个实际不可逆的反应步骤当然更为多变和灵活。对于多步骤的另一更重要的理由是:当分解代谢时,从 ADP 和磷酸根形成一分子 ATP,需要特殊且定量的自由能;反之,在生物合成过程中,一分子 ATP 所能释出的自由能也有一个最大的极限值。代谢过程包含许多步骤。因此,那些供给化学能的和那些需要化学能的都得遵循细胞内能流量的大小,即指蕴藏在一个 ATP 分子末端磷酸基团中自由能的贮存量或“量子”的多少。

### 多 酶 体 系

酶是中间代谢的催化单位。它们作用时往往是顺序催化一些由一般中间产物联系着的连续反应,因而前一酶的产物就成为下一酶的底物,如此类推。多酶体系无论在何处都是由 2 至 20 个甚或更多的顺序作用的酶所构成。中间代谢的连续反应多半是酶促转移氢原子、水分子或是特殊功能基,如氨基、乙酰基、磷酸根、甲基、甲酰基、羧基或腺苷酰基。

关于多酶体系的组合,按其复杂程度可分为三种不同水平。最简单的多酶体系,每一种酶都存在于胞浆的溶液中,呈独立的分子,在它们作用的任何时期彼此之间没有直接联系。在这种酶系,其中间产物的分子往往是比较还小很多,因此具有较高的扩散速度,可以十分迅速地从一个酶分子弥散至顺序中的下一个酶分子处。(图 14-4)

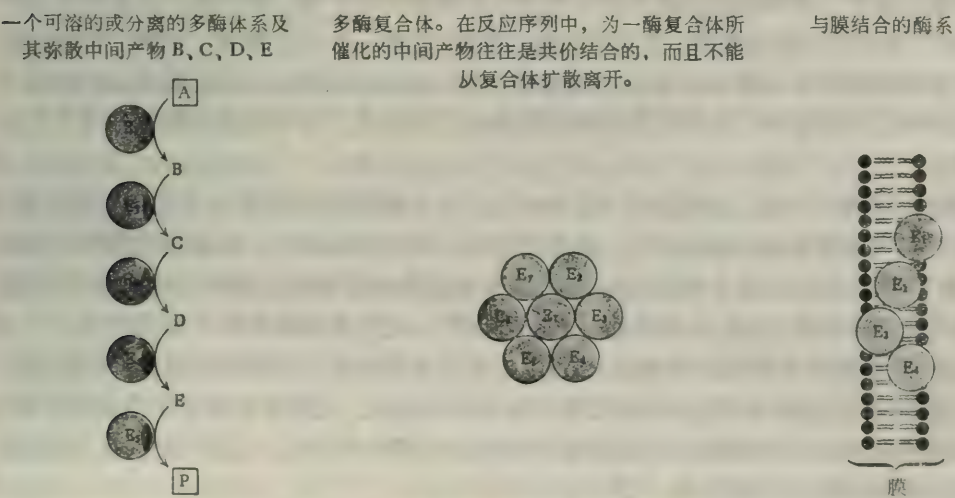


图 14-4 多酶体系的类型

另一种多酶体系,其组合程度较高,每种酶都是物理结合在一起的,并且如同多酶复

合体一样共同起作用(图 14-4)。例如,酵母的脂肪酸合成酶系,催化从小分子前体合成脂肪酸。这是一个需要七种不同的酶有顺序地配合起作用的过程。每一种酶的一个分子组成一个紧密结合的束或复合体,且不易解离,事实上,分开的酶分子是没有活性的。这种活性酶分子顺序排列成不解离的复合体,在生物学上是有利的,它缩短了顺序反应过程中底物分子弥散的距离。实际上,在酵母的脂肪酸合成酶系中,顺序反应中的各种中间产物都是以共价相结合,从不离开复合体。

那些和巨大的超分子结构(如膜或核蛋白体)联系在一起的多酶体系是最复杂和高度组合的(图 14-4)。重要的例子如:异养细胞中将电子从底物转移至氧的递电子酶链。这些酶附着在线粒体内膜,实际上已成为其结构部分。愈是复杂的酶系,愈可能和某些细胞器或其他细胞内结构结合。

显然,多酶体系的动力学行为比单个酶的更难于定量分析。多酶顺序中的每个成员不仅有它自己对每一底物和辅助因素特有的  $K_M$ , 而且有特定的  $V_{max}$  和所要求的 pH。每个别反应步骤的速度取决于代谢顺序中该反应中间产物的恒态浓度和该酶的浓度。多酶序列中的第一个反应往往决定整个系统的速度;也恰恰是这种反应常常是由调节酶催化。多酶体系的动力学常可借电子计算机来模拟,可以从每个酶的已知  $K_M$  和  $V_{max}$  值、中间产物的恒态浓度,以及参与顺序反应的调节酶的特性开始进行模拟。

## 分解、合成和无定向代谢途径

细胞内大量的各种养料(即糖、脂类、蛋白质)的降解作用都是通过一系列连续的酶促反应进行的。这些反应组成三个主要阶段(图 14-5)。(核酸虽然占细胞干重相当大的部分,但多数机体都不用它们作为能源,所以不在此讨论)。分解代谢的第 I 阶段,大分子营养物降解成其主要的结构单位。所以多糖降解成己糖或戊糖;脂类分解成脂酸、甘油和其他组分;蛋白质分解为其氨基酸组分。在分解代谢的第 II 阶段,将第一阶段许多不同的产物集合起来,并转化成少数几种仍然是较简单的中间产物。如己糖、戊糖和甘油降解,经由三碳中间产物丙酮酸,生成单一的二碳物、乙酰 CoA 的乙酰基。同样,各种脂肪酸和氨基酸降解产生乙酰 CoA 和几种别的终产物。最后,乙酰 CoA 的乙酰基以及阶段 II 的其他产物进入阶段 III,即最后共同的分解途径。在这里,各种物质最终氧化为二氧化碳和水。

生物合成也可分为三个阶段进行(图 14-5)。从分解代谢阶段 III 生成的小分子前体,在阶段 II 转化成基本结构单位分子,最后在阶段 I 聚合成大分子。例如蛋白质的生物合成,以第 III 阶段形成某些  $\alpha$ -酮酸为起点。这些  $\alpha$ -酮酸是氨基酸的前体,它们到阶段 II 时为氨基供体所氨基化,生成  $\alpha$ -氨基酸,最后至阶段 I,这些氨基酸便聚合成多肽链。

应注意,代谢的分解途径开始是分散的,从许多不同的糖类、脂类和蛋白质类为起点,最后于第 III 阶段汇集成一条共同的通路(图 14-6)。反之,生物合成途径则是辐散状的;它们始自阶段 III 的几种前体。当这些途径经阶段 II 和阶段 I 时,它们分支发散,导致许多不同种类的生物分子的生成。(图 14-6)

现在我们谈一谈另一重要问题。在某种前体和某种产物之间,分解和合成并非彼此互逆。例如,糖原降解成乳酸是由一系列十二种已知酶来催化这些顺序反应的。而从乳



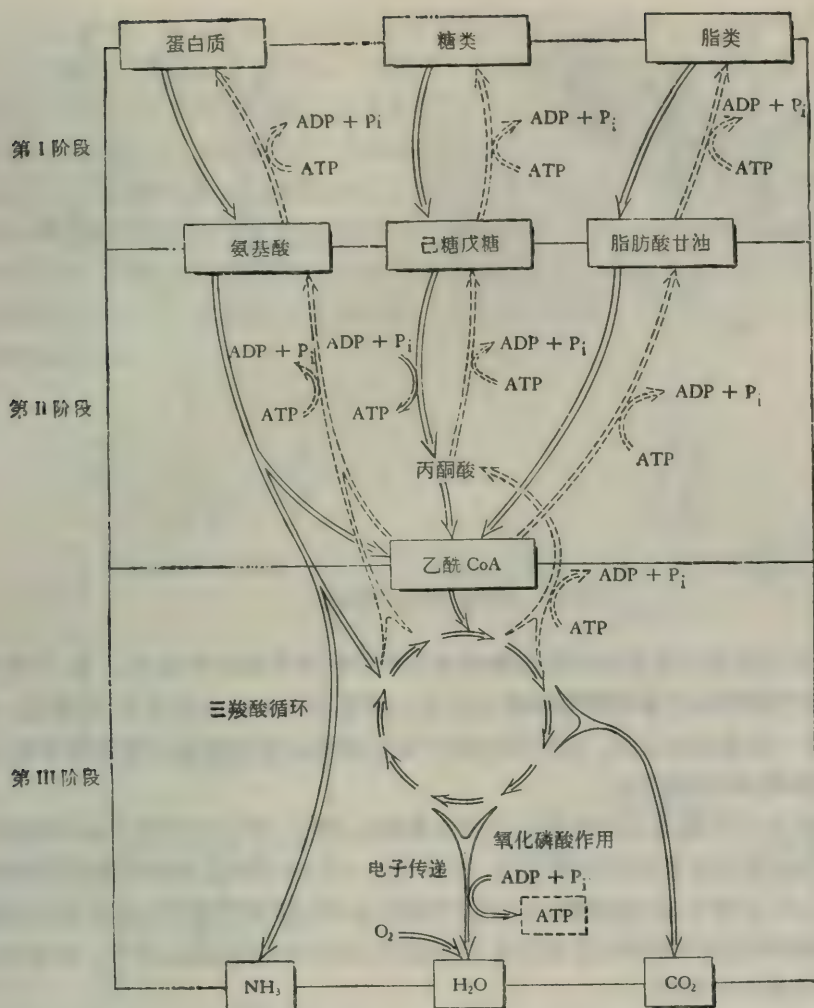
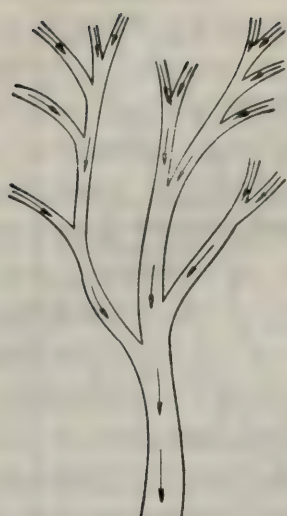


图 14-5 代谢的三阶段

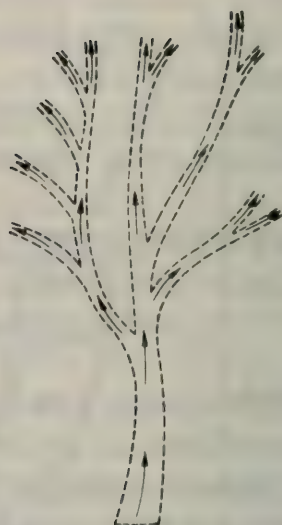
分解途径(朝下的粗箭头)汇集到共同的终产物,且导致第III阶段 ATP 的合成。合成(生物合成)途径(朝上的虚线箭头)始自阶段 III 的几个前体,并需耗用 ATP 的能量以生成许多不同的细胞组分。

酸合成糖原,乍看就是该十二步酶反应的简单逆过程,这似乎既合逻辑又经济。然而从乳酸合成糖原那十二步酶促降解反应中,其实仅仅九步是可逆的。其余三步由于能量因素阻碍了简单地逆向,因而在生物合成方向时,则须经由不同的酶和中间产物来组成旁路。氨基酸和蛋白质之间的分解和合成途径也不尽相同,脂肪酸和乙酰 CoA 之间也一样。虽然用两套代谢途径(一套分解,一套合成)似乎有些浪费,但是这种安排具有重要的优点。的确,这种平行路线对能量产生和能量需要的途径是必要的,因为分解代谢所循的路线在能量上不可能适合于合成代谢。复杂的有机分子降解时,在能量学上是走“下坡”路,而其合成则是走“上坡”路。正如图 14-5 所示,分解代谢途径,特别是阶段 III 的氧化磷酸化过程,在各燃料分子降解时,利用所产生的自由能可使 ADP 和磷酸合成 ATP。反之,生物合成途径是“上坡”,需要补给 ATP,并伴随着 ATP 分解为 ADP 和磷酸。

分解途径和合成途径各不相干还有另外的好处,就是它们可以分开调节。例如,糖原



分解代谢的汇聚途径



生物合成的辐散途径

图 14-6 代谢途径的汇聚和辐散

分解为乳酸的速度和逆过程乳酸转化成糖原是由不同的调节酶所控制的。由于这个缘故,所以糖原和乳酸间的代谢流通就可以从两个方面进行十分有效的调节;如果这一条途径开放,那么那一条途径就关闭。对于所有相对应的或平行的合成和分解途径来说,双重调节是带有普遍规律性的特征。

分解代谢和合成代谢在另一重要的方面也是有区别的,即它们发生在真核细胞内不同的部位。例如,脂肪酸氧化至乙酰 CoA 阶段是由一组位于线粒体内的酶系所作用的,但是从乙酰 CoA 生物合成脂肪酸则是由位于线粒体外的胞浆中的另一组不同的酶系所催化。由于方向相反的分解和合成途径位于细胞内不同的区域而得以分开,使这些过程既能互不相扰又能同时进行。

虽然,分解代谢和合成代谢相应的途径是不一样的,但是阶段 III 却构成了对两者都可通行的中心汇合地或通路。这个共同的中心通路有时称之为无定向代谢途径 (amphibolic pathway),它具有双重功用(希腊语 amphi 是二者之意)。此无定向代谢途径可用于分解,使分解代谢阶段 II 所产生的小分子彻底降解;它亦适用于合成,供给一些小分子,作为生物合成反应的前体。

## 细胞内的能量循环

复杂的有机分子如糖,由于它们高度的结构秩序,所以蕴藏势能也多,它们的无规则性或熵则较少(第十五章将阐述得更确切)。当葡萄糖分子被分子氧氧化成 6 分子  $\text{CO}_2$  和 6 分子水时,其碳原子的无规则性增加,它们以  $\text{CO}_2$  的形式彼此分开,相互间可以有許多不同的位置关系。这种转化意味着其组成原子的自由度增加,结果使葡萄糖分子丢失自由能。所谓自由能就是一种可以在恒温恒压条件下做功的能的形式。

生物氧化在本质上就是无火焰的低温燃烧。正如我们在绪论中所谈过,热不能被活



机体利用为能源,因为活机体实质上是等温的;而在恒压条件下,热能只有从一物体流向另一温度较低的物体时才能做功。取而代之的是细胞燃料的自由能贮为化学能,即三磷酸腺苷分子末端磷酸根的共价键结构中所固有的化学能,正如图 14-5 所表示的那样。ATP 由二磷酸腺苷 (ADP) 和来自酶促转磷酸根反应的无机磷酸所合成,而这种转磷酸根反应在化学上是和分解代谢的特定的氧化步骤相偶联。于是如此生成的 ATP 就能够在细胞内弥散到需要它供能的地方,所以它成为自由能的一种转移形式。ATP 运转的化学能可以随 ATP 末端磷酸根转移给某些特定的受体分子,使这些受体分子能量化,而后成为较大的生物分子的前体 (图 14-5)。ATP 循环如图 14-7 所表示,并将于第十五章进一步详细讨论。

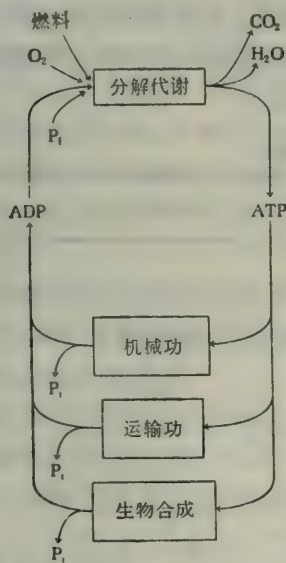


图 14-7 ATP-ADP 循环

ATP 的高能磷酸键以偶联反应的方式用于需要能量的一些机能。最后,无机磷酸根被释放。分解代谢进行放能时,ADP 再磷酸化成 ATP。

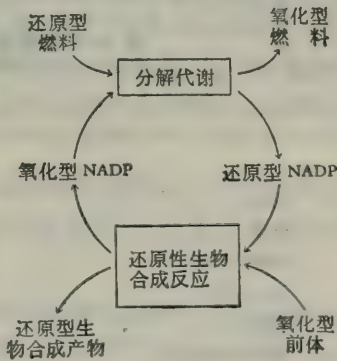


图 14-8 借助菸酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸盐 (NADP) 循环运转还原力。其他递电子辅酶,如黄素核苷酸也参加还原性生物合成作用。

电子是从分解代谢产能反应到生物合成的需能反应提供转移化学能的另一种工具。合成某些含氢丰富的生物分子,如脂肪酸和胆固醇时,常需要电子或氢原子,以便还原双键成单键。从分解代谢的释放电子反应通过酶的作用将电子转移至需电子的基团,如碳-碳或碳-氧双键时,借助于递电子辅酶,其中最重要的有菸酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (NADP)。所以, NADP 作为一种传递体,它能把分解反应中的高能电子带给需电子的合成反应 (图 14-8),正好像 ATP 是磷酸根和能量的传递体,由分解反应传递给合成反应。

### 代谢转换：细胞组分的动态

长久以来,广泛地认为细胞蛋白质在细胞生命期间是不变且稳定的。这种观点并非没有道理,因为从蛋白质的组分氨基酸合成蛋白质分子,需要做相当大量的化学工作。然

而,这个概念在1930年特别是由于 R. Schoenheimer 及其共同工作者们的研究工作而被推翻了。用重同位素  $^{15}\text{N}$  (正常而又最多的同位素氮是  $^{14}\text{N}$ ) 标志的氨基酸饲养动物时,标志的氨基酸迅速进入肝脏蛋白质的多肽链中,而肝脏蛋白质的总量并无改变。如果除去饮食中带标志的氨基酸,代之以正常的或  $^{14}\text{N}$  氨基酸,那么早先已标志的肝脏蛋白质很快就失去它们的同位素氮,同样,肝脏蛋白质总量仍无改变。Schoenheimer 的结论认为,肝细胞蛋白质是处于一种动态稳定状态(dynamic steady state),在这种情况下,相当高的合成速度正好为相当高的降解速度所抗衡。因此,肝脏蛋白质是在进行代谢转换的。大鼠肝脏蛋白质的半衰期约为5—6天,而肝细胞本身的半衰期则有几个月(表14-4)。在另一方面,肌肉组织的蛋白质转换很慢,脑的脂类也一样。如表14-4所示,每个器官的主要分子组成有其特定的转换率。细胞或组织(如肝和小肠粘膜)必须使它们自己能迅速适应外源性营养料的化学组成的变化,所以它们的代谢转换特别快。这些组织能迅速地从氨基酸合成特殊的酶类,以催化对正在改变的摄入养料中新有机成分的利用;在不再需要时这种酶就降解,而且为适应摄入养料变化的一些其他酶所代替。

表 14-4 大鼠组织某些组分的转换

组 织	半衰期(天)
肝	
总蛋白	5—6
糖原	0.5—1.0
磷酸甘油酯	1—2
甘油三酯	1—2
胆固醇	5—7
线粒体蛋白质	5—6
肌肉	
总蛋白	30
糖原	0.5—1.0
脑	
甘油三酯	10—15
磷脂	200
胆固醇	>100

## 中间代谢的实验研究方法

对某一代谢序列反应进行实验分析时,主要目的有二。第一是对序列中每一反应步骤的化学通路、化学计量和作用机理的认识。这方面涉及对代谢通路每一中间产物的鉴定和序列反应中每个酶的提取、纯化、酶的特异性、动力学作用、作用机理以及抑制作用的研究。最终的目的是达到从高度提纯的已知成分开始,在试管内再造酶体系。第二个主要目的是探讨代谢通路速度调节的机理,这涉及通路中调节酶类的鉴定,以及它们对特殊调节性代谢的反应。

采用从完整机体开始的一系列连续的实验方法,才能对代谢通路从实验上有所阐明。



## 在完整机体上进行代谢研究

用完整机体研究代谢摄入与排出的平衡,使某些主要代谢途径的起始和终末情况得到阐明。二氧化碳就是这样,它可以从动物的呼吸和尿中定量回收,所以被认为是糖类氧化的最终产物。同样地,已证明乙醇和二氧化碳是酵母使葡萄糖发酵的主要产物,而某些哺乳动物尿中的尿素已确定是蛋白质降解的主要含氮终产物。然而用这种平衡实验方法却不能认识主要养料分解代谢的中间步骤。

虽然代谢的中间产物正常时在细胞内是处于低的恒态浓度,但是在应激状态下、或是由于功能紊乱或疾病引起平衡失调时,某些特殊的代谢物就会积聚,成为某一定代谢途径或其中某一步的化学性质的重要线索。例如,很早就观察到,当肌肉反复收缩时,血中出现大量乳酸,而肌糖原消失,说明六碳葡萄糖分子分解成了三碳碎片。另外的例子是,研究禁食的或糖尿病动物,其葡萄糖的利用发生障碍,脂肪酸成了主要能源。在这种动物的血和尿中出现大量酮体( $\beta$ -羟丁酸、乙酰乙酸),因此这就被认为是脂肪酸氧化的中间产物。而在糖尿病动物,若饲以某些特殊的氨基酸,如丙氨酸或谷氨酸时,葡萄糖的排出就增加。说明这些氨基酸的碳架可作为葡萄糖的前体。另一方面,饲以酪氨酸和苯丙氨酸,不增加葡萄糖的排出,但增加乙酰乙酸的形成,说明这两种氨基酸的碳架在代谢上转化成了乙酰乙酸。

用某些药物或抑制剂处理完整的机体,也引起血液和组织中特殊代谢物的聚积。例如,给予动物以氟柠檬酸,使某些动物肝脏中柠檬酸堆积,这是由于它竞争性地抑制了柠檬酸的酶促氧化的缘故。

以血液或含有代谢前体的缓冲生理盐溶液灌注离体器官(如肝或肾)的血管系统,然后取灌流液进行化学分析,这是对代谢途径提供有价值资料的另一种实验手段。运用了这种方法,确定了肝脏是生成酮体、尿素,以及将某些氨基酸转化成葡萄糖的主要场所。

## 存活切片和测压法

另一种早期研究动植物组织中间代谢广泛使用的技术是1920年O. Warburg创立的存活切片法。将动物或植物的固体组织制成薄片,其中大部分细胞仍保留完整。这种切片必须很薄( $<0.4$ 毫米)以保证氧气和代谢物在细胞和它的悬液之间进出的扩散速度不致限制细胞内的代谢交换速度。将组织切片置于含一定代谢物的介质中进行培养,研究此代谢物转化为代谢产物(聚积在介质中)的情况。许多代谢反应速度,例如,动物组织将葡萄糖变成乳酸的速度,可借助于化学方法将组织切片悬浮液中的变化测定出来。测存活组织切片的耗氧速度也行。测量组织悬浮液上氧分压降低的测压装置叫做Warburg-Barcroft仪(图14-9)。测压技术在阐明三羧酸循环的反应方面很重要。

## 代谢遗传缺陷;营养缺陷的突变型

为了研究完整细胞和机体的中间代谢,另一重要的途径是利用机体的遗传突变型得到的,这种机体不能合成某种酶。如果这种遗传缺陷还不是致死性的,那么此缺陷酶的底物往往就会积聚和排出。而在正常的或无突变的机体,当然就不会有这种中间物堆积的情况,因为它可以进一步进行代谢转化。鉴定突变型机体排泄的代谢物,对于代谢途径的

阐明是很有价值的。有一种病人从尿中不正常地排泄尿黑酸，就是由于一种遗传性缺陷所致，称为尿黑酸尿。若摄食苯丙氨酸或酪氨酸时，尿黑酸排出增多，而摄取别的氨基酸则不会如此。因而，结论认为尿黑酸是苯丙氨酸和酪氨酸分解时形成的中间产物。已知人类还有多种其他氨基酸代谢的遗传缺陷，为了解氨基酸分解代谢中间反应步骤的性质提供了重要的证据。

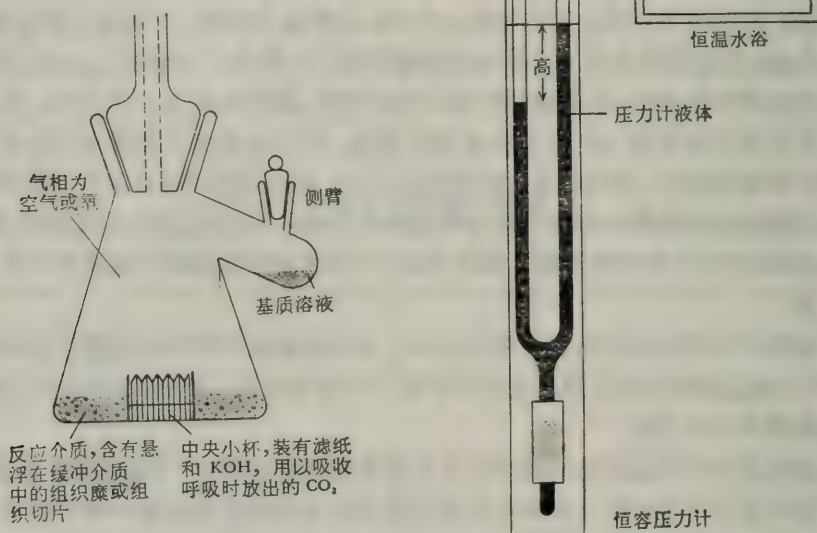


图 14-9 测定组织切片或磨碎组织悬浮液氧耗量的 Warburg-Barcroft 仪器

在一特殊反应瓶中进行培养，此瓶连至一个能读出呼吸时氧压降低的压力计。反应瓶浸在恒温水浴中，震荡。中央小杯中的 KOH 不断地从气相中吸收呼吸时放出的二氧化碳。这样可使气相中二氧化碳分压保持为零或接近零。观察到的压力变化才纯系氧压改变所引起的。通过对悬浮液进行化学分析可测定代谢物的消耗或产生量。

对研究代谢更为有益的是利用微生物，以各种诱变剂，如 X 射线，使之诱导生成特殊的遗传缺陷。可根据人的旨意直接造成某种特殊的代谢途径或酶的突变型微生物，这已成为研究中间代谢的有效工具了。1941 年 G. W. Beadle 和 E. L. Tatum 根据他们对链孢霉 (*Neurospora crassa*) 突变型的研究，提出“一个基因一种酶”的学说。他们所做的这些探讨是极其重要的，不仅在研究基因和酶的关系方面，而且在分析中间代谢途径方面也很重要。野生型，即未变异的链孢霉，可以在含葡萄糖作为唯一碳源和氨作为氮源的简单培养基中生长。如果将链孢霉的孢子暴露于 X 射线下时，可产生一些突变型细胞，它们不再能在这种简单的培养基中生长。但是如果向培养基中添加特殊的代谢物（其生物合成已因突变而遭损坏的），那么这种突变细胞就可以正常生长。例如：链孢霉的某些突变体，除非培养基中含精氨酸，否则它就不生长。说明从氨合成精氨酸需要一种酶，它正是这些突变型的遗传缺陷。由于缺乏精氨酸，所以这种突变型细胞就不能制造它们的蛋白质。只有当培养基中供应精氨酸时，这种突变细胞才能利用精氨酸以合成蛋白质而正常生长。进一步研究还发现链孢霉的各种突变型在制造精氨酸的能力方面，其缺陷并不相



同，而是在生物合成精氨酸时发生遗传缺陷的特定步骤有所不同。已发现精氨酸合成障碍的突变型 I (图 14-10) 只在培养基中添加精氨酸时才能维持生长，而添加任何已知的精氨酸前体，如代谢物 A、B、C 或 D 都不生长，说明此突变型的缺陷是在酶  $E_4$ 。但是，在精氨酸合成障碍的突变型 II，当培养基中加有前体 D 或精氨酸时可以生长，若供给前体 A、B 或 C 时却不生长，说明精氨酸合成以及生长是因缺少  $E_3$  而被阻断。这些代谢通路受阻于不同部位的突变型可利用来检知某种产物的设想的前体，以及鉴定前体转化成产物的反应的顺序。

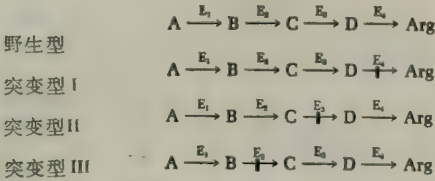


图 14-10 链孢霉的营养缺陷突变型,其缺陷酶发生于从前体 A 生物合成精氨酸的不同部位。

这组突变型还可从另一方面来鉴定生物化学序列反应中的中间产物。例如，当突变型 I (图 14-10) 在只含少量有限的精氨酸培养基中生长时，培养基中就会有受阻断的前体 D 的堆积，因为它不能转化成精氨酸。将突变型 I 的细胞过滤除去，剩下的培养基将能够支持突变型 II 在缺少精氨酸的情况下生长，因为它有前体 D 的供应。但是突变型 II 的滤液却不能支持突变型 I 生长。这一类实验谓之交叉饲养 (cross-feeding)。这种由突变型 I 产生的能供养突变型 II 的前体，可以被提取和鉴定；突变型 II 的生长速度可作为前体生物鉴定的指标。凡属有某一生物合成途径缺陷的突变型，当供给它们以此途径的正常产物时，便恢复正常生长者称为营养缺陷突变型。

突变型也可用于分析分解代谢途径。例如：野生型大肠杆菌细胞能以乳糖、葡萄糖或半乳糖为碳源而生长。有些大肠杆菌突变型丧失利用乳糖的能力，但是有其他的糖时，它还是可以生长。这种情况下，遗传缺陷发生在：促进乳糖水解成其组分葡萄糖和半乳糖的  $\beta$ -半乳糖苷酶上。通过这种应用微生物突变型的遗传方法，已经鉴定出代谢途径中的许多中间产物。

### 同位素标志法

另一种应用于研究完整机体代谢的有效方法是用标志的代谢物追踪它的代谢去路，早在 1904 年就开始应用这一方法，德国生物化学家 F. Knoop 发现，若以苯基取代并连接到脂肪酸末端的甲基碳原子上，则在整个脂肪酸氧化降解过程中，此苯基始终和这碳原子相连。以这种苯代长链脂肪酸喂养动物，其尿中便有苯代降解产物的排泄，从这些产物的结构，Knoop 提出：脂肪酸氧化是连续地每次断裂两个碳原子。这种原始的化学标志方法已经被同位素标志代谢物的方法所代替，即用稳定的或放射性的同位素标志一定代谢物的某个原子，因而这样的代谢物在所有实际工作中，在化学上和生物学上都与其正常同类物没有区别。正因同位素的存在，使代谢物及其转化产物能被鉴别和测定 (表 14-5)。对于完整动物、植物、微生物以及离体器官或组织抽提物进行一些超出一般范围的重要观察。其中之一即发现胆固醇的碳原子是来自乙酸，甘氨酸则是合成嘌呤和嘧啶的前体。如果不用同位素标志的代谢物，要想研究代谢的多个方面 (包括代谢周转率、蛋白质和核

酸的生物合成以及光合作用)必然是十分不可能的。

表 14-5 某些用作示踪物的同位素\*

同 位 素	相对自然丰度, %	射线种类	半衰期
$^1_1\text{H}$	0.0154	$\beta^-$	稳定
$^2_1\text{H}$			12.1 年
$^{12}_6\text{C}$	1.1	$\beta^-$	稳定
$^{14}_6\text{C}$			5,700 年
$^{15}_7\text{N}$	0.365		稳定
$^{18}_8\text{O}$	0.204		稳定
$^{24}_{11}\text{Na}$		$\beta^-, \gamma$	15 小时
$^{32}_{15}\text{P}$		$\beta^-$	14.3 日
$^{35}_{16}\text{S}$		$\beta^-$	87.1 日
$^{36}_{17}\text{Cl}$		$\beta^-$	$3.1 \times 10^5$ 年
$^{42}_{19}\text{K}$		$\beta^-$	12.5 小时
$^{45}_{20}\text{Ca}$		$\beta^-$	152 日
$^{59}_{26}\text{Fe}$		$\beta^-, \gamma$	45 日
$^{131}_{53}\text{I}$		$\beta^-, \gamma$	8 日

\* 元素符号前左上方的标记表示质量数, 左下方表示原子序数。 $\beta^-$ 射线来自负电子。放射强度以居里 (Ci) 为单位, 其量相当于 1.0 克镭每秒钟的衰变数 ( $3.7 \times 10^{10}$ /秒); 用毫居里和微居里做单位更合适。稳定的同位素用超过自然丰度的原子百分数来度量。

同位素示踪法也可用于测定完整机体的代谢速率, 以及对某一定的代谢物而言, 测知某一代谢通路是否为主要途径。此种方法也用于鉴定那些根据试管内离体酶的研究而拟订出来的代谢途径究竟在完整细胞内是否也真正存在。(见第十七章)

## 无细胞体系

为鉴定某代谢序列的个别反应步骤时, 最直接的实验手段是用细胞膜已破, 细胞内容物已释出的细胞或组织悬浮液来进行研究。这种悬浮液或经离心制备的可溶性抽提液常常可导出一个完全的代谢序列。而我们现有的关于葡萄糖转化成乙醇和二氧化碳的详细信息正源自于 1897 年 E. Buchner 的工作, 他发现无细胞的酵母提取液催化葡萄糖生醇发酵, 产生乙醇和  $\text{CO}_2$ 。与此相似, 后来证明在无细胞的肌肉提取液中, 葡萄糖可转化成乳酸。只要有了这种制剂, 那么使用一些特殊的酶抑制剂, 使特定的酶失活, 或是从抽提液中除去重要的辅酶, 便可导致代谢中间物的聚积。对上述处理后积聚的中间物进行化学鉴定, 就可以验证形成该中间物的酶反应以及利用该中间物的酶反应。最后, 就可自抽提液中将这酶分离出来。最终目的是须在体外从高度提纯的酶、辅酶及其他成分开始, 把这种酶系统部分或全部重新组合起来。

如果是在等渗蔗糖溶液内温和地匀浆, 使细胞破裂, 那么那些亚细胞器, 如细胞核、线粒体和溶酶体, 以及那些超分子结构的核蛋白体就可保持完整, 而且可以借差速离心法从匀浆分离出来 (图 14-11)。然后可在体外检测这些分离部分对某已知代谢序列的催化能力。就是这种办法证明了分离线粒体能催化构成三羧循环的整个序列反应。从分离线粒体制备的抽提液可以作为追踪脂肪酸氧化的酶促反应的起点, 也可以作为分离参与此反应的酶的起点。同样已分离的核蛋白体可用来研究蛋白质合成的途径和机制。



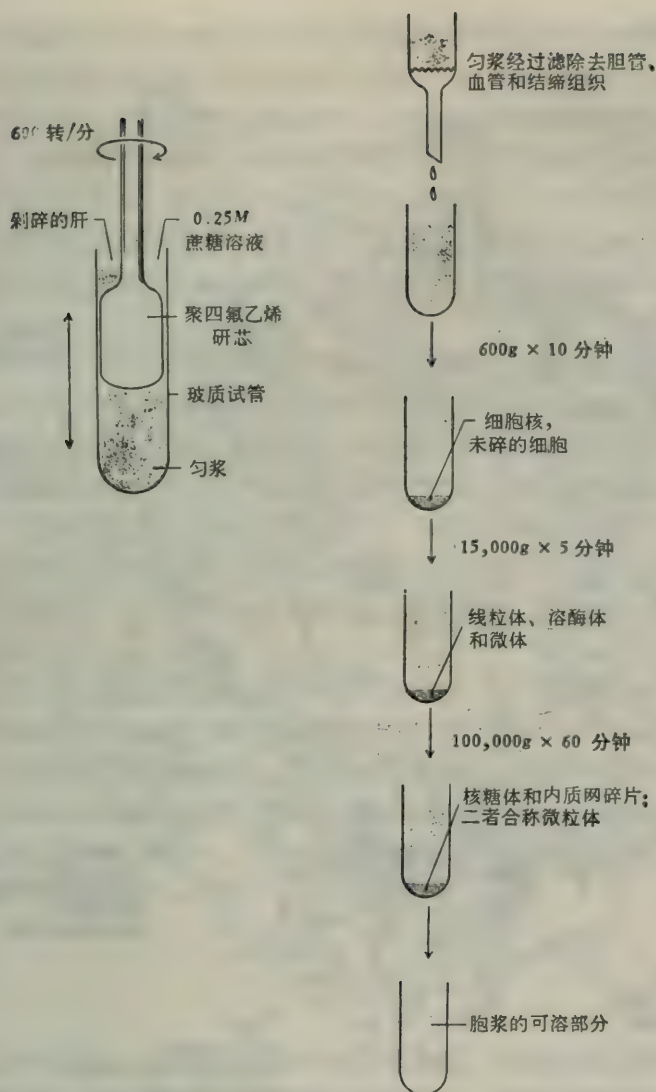


图 14-11 用差速离心法分离鼠肝细胞内的结构。细胞膜受旋转着的匀浆器研芯的磨碎力作用而破裂。随即用不锈钢筛滤去结缔组织和血管及胆管的碎片，细胞提取液则用一系列递增的转速进行离心。

## 酶和酶系的细胞内区域化

真核细胞的不同的酶和酶系是特征性分布在这个或那个细胞器或细胞内结构上的(图 14-12)。整个糖酵解酶系都分布在胞浆的可溶部分，即胞汁中，而有关丙酮酸、脂肪酸和某些氨基酸通过三羧环氧化的酶系则位于线粒体上，电子传递酶系和 ADP 的氧化磷酸化酶系也同样位于线粒体上。

酶体系的区域化还可使细胞内的一些活性受到调节和整合。例如，从丙酮酸生物合成葡萄糖牵涉到一系列酶的复杂的交互作用，这些酶有的位于线粒体上，有的则在胞浆的可溶部分中。总反应速度不仅决定于两区域中调节酶的活性，而且也决定于主要中间产

物横过线粒体膜的交换速度。

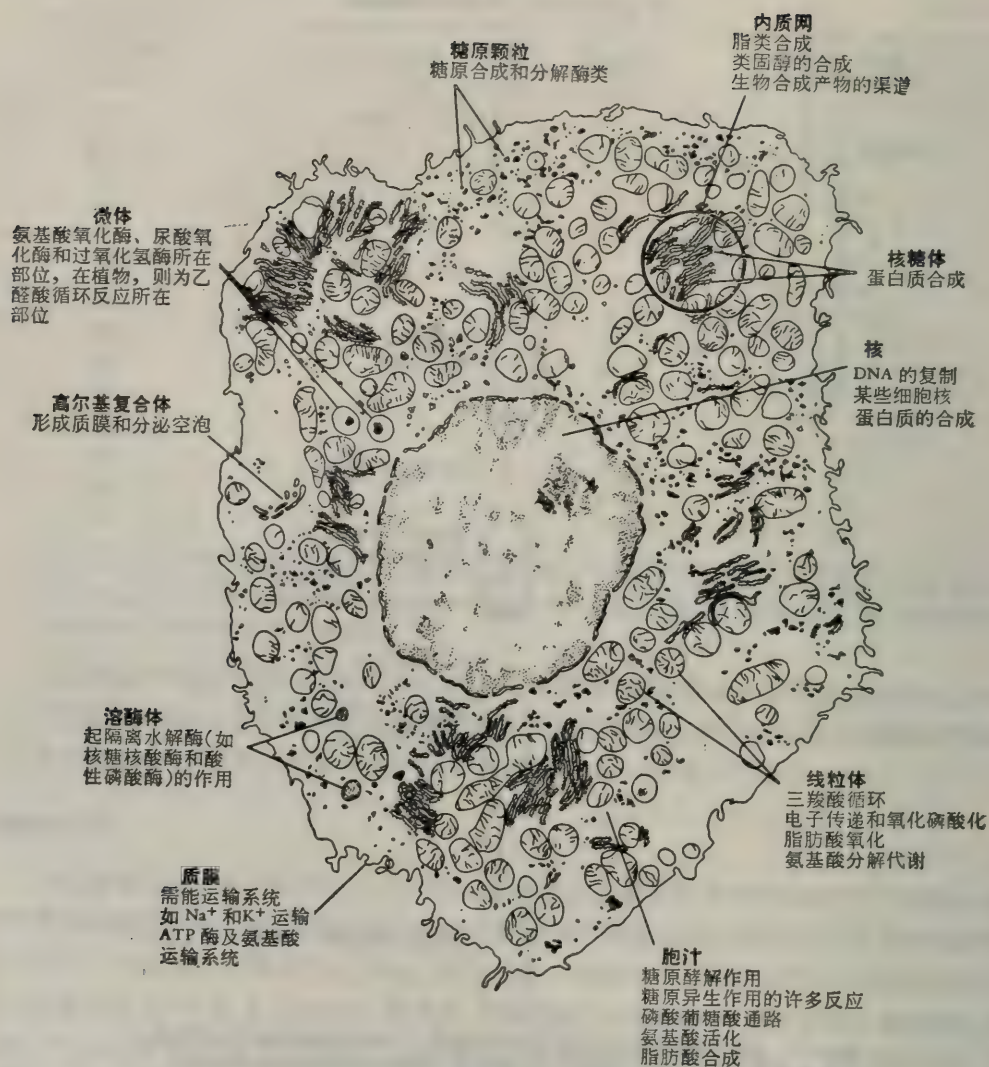


图 14-12 大白鼠肝细胞中某些重要酶类和代谢序列的区域化, 细胞的电子显微结构, 摘自图 1-8。

## 代谢途径的细胞调节

一般情况下, 细胞的分解代谢速度不受周围环境中养料浓度调节, 而受细胞每时每刻所需要的能量 (ATP 形式) 调节。简单地说, 在任何瞬间, 细胞消耗燃料的速度仅仅和必须供给它们活动所需能量的速度一样快。同样细胞组分的生物合成速度也被调节到适应及时的需要。例如, 细胞合成氨基酸的快慢只须调节到正好和它们的利用相适应。因此, 在细胞代谢的各个方面都体现出最经济的原则。(见绪论)

代谢途径的调节可以有几种水平。每一酶促反应的速度是 pH 和细胞内底物、产物和辅助因子的浓度的函数; pH 和这些物质的浓度都是酶活性调节的基本因素。



关于代谢序列调节的第二种水平,是通过调节酶的作用实现的。许多调节酶可以被它们起作用的顺序中的终产物所抑制。例如,与 ATP 生成有关的酶系和分解代谢相偶联,终产物 ATP 可能是分解代谢顺序中早期的一种变构酶的特殊抑制剂。在生物合成酶系统中,终产物经常起变构抑制剂的作用。此外,有些调节酶可被特殊的代谢物(有时就是它们自己的底物)所活化或激活。有的变构酶正好位于代谢通路的分支点。这样的酶往往是多价的,就是说它们可能对二个或更多的激动剂或抑制剂有反应,而这些激动剂或抑制剂可以就是两条支路的产物。这样,多价变构酶就能整合两个或多个酶系统的速度。

第三种代谢调节的水平是通过遗传控制酶的合成速度来实现的。某一已知代谢序列的速度取决于这序列中每种酶(活性型)的浓度,换言之,就是取决于酶合成速度和降解速度平衡的结果。凡属在某一定细胞内,含量经常近乎恒定的酶,称之为组成酶。而那些只因有某种底物的存在才合成的酶,称之为诱导酶。合成诱导酶的专一基因通常处于阻遏状态,只有当诱导剂存在时它们才发挥作用,即进行解阻遏。一个完整的酶系可以像一个群体一样,同时受阻遏或同时被诱导;它们的合成是由 DNA 上一组连续基因来编码,这种基因称之为操纵子,它们可以一起被阻遏或解除阻遏。关于酶合成的调节将在第 35 章较详细地叙述。

在有内分泌系统的高等多细胞机体中还有另一种代谢调节水平。内分泌腺产生的激素是化学信使,它们能经由血液到达某一定的“靶”组织,在那里刺激或抑制特殊的代谢活性。缺乏胰腺所分泌的胰岛素时,可使葡萄糖运转进入细胞内受阻,导致一系列继发的代谢效应,诸如由葡萄糖生物合成脂肪酸减少,以及肝脏生成的酮体则大增。注射极微量的胰岛素就可以弥补这些缺陷。和胰岛素作用相反的是胰高血糖素,它是胰腺所分泌的另一种激素。有关激素的作用将在别章详细讨论。

## 摘 要

有机体可根据它们对外源性碳的需要来分类。自养生物只需要二氧化碳,而异养生物所需的碳含在较复杂的还原型物质如葡萄糖中。有机体也可根据其所需能源来分类:光型自光线获取能量,而化学型则从氧化还原反应获取能量。凡利用无机还原剂作为电子供体的叫无机型,而那些利用有机分子的叫有机型。光合自养型和化学有机型彼此互相“饲养”:光合细胞利用大气的二氧化碳和太阳能以合成葡萄糖和释放氧。而化学有机型动物细胞则消耗分子氧来氧化葡萄糖和其他光合产物,并产生能量和释放二氧化碳。对所有的生命形式来说,太阳能是最根本的能源。

在生物氮循环中,植物从硝酸盐取得氮,并将它还原成氨和氨基酸;然后这些氨基酸就为动物所利用,而且以尿素或氨的形式释回到土壤中,重新被土壤细菌氧化成硝酸盐。只有固定氮的细菌能利用大气中的分子氮。有些生物需要外源性的或者现成的氨基酸、嘌呤或嘧啶为氮源。

中间代谢可分为分解过程和合成过程,前者使富含能量的养料分子降解,后者生物合成细胞的组分,而中心无定向途径则具有分解合成两种能力。每条途径都由一系列特殊的并催化连续反应的酶所促进。合成或分解某种养料,例如葡萄糖,其途径并非正好彼此

可逆;它们在化学反应和参与的酶方面都不相同。此外,在调节上它们各不相干,而且往往分布在细胞内的不同部分。养料分子分解时常伴有能量贮存,即养料的一些能量以三磷酸腺苷(ATP)的磷酸键能贮存起来。反之,生物合成途径所需要的化学能则由ATP去磷酸化作用供给。从分解代谢将化学能递给合成代谢也可以依靠还原型辅酶的方式,特别是NADPH。

研究完整细胞的代谢途径,可采用正常的、病理的、处于应激状态的或中毒的机体,以研究其摄入和排出,或采用完整器官灌流和对存活的组织切片进行研究。有遗传缺陷的微生物,所谓营养缺陷体,对于分析代谢途径也是十分有用的。同位素示踪技术是研究代谢途径、速度和各种代谢紊乱时最有效的工具。只要在没有细胞体系中能证明有某种代谢变化存在,那么催化各反应的个别酶就可以分离和鉴定。代谢可通过酶的内在动力学性质和通过调节酶或变构酶的作用进行调节,也可通过改变酶的生物合成速度以及激素的作用而调节。

## 参 考 文 献

### 书籍

- Birnie, G. D. (ed.): *Subcellular Components: Preparation and Fractionation*, 2d ed., University Park Press, Baltimore, 1972.
- Chase, G. D., and J. L. Rabinowitz: *Principles of Radioisotope Methodology*, 2d ed., Burgess, Minneapolis, 1962.
- Colowick, S. P., and N. O. Kaplan: *Methods in Enzymology*, Academic, New York, 1955 to present. Multivolume treatise on experimental methods in study of intermediary metabolism.
- Dagley, S., and D. E. Nicholson: *Metabolic Pathways*, Wiley, New York, 1970. Comprehensive compilation of "metabolic maps," showing pathways and names of enzymes. Very useful for reference.
- Green, D. E., and R. F. Goldberger: *Molecular Insights into the Living Process*, Academic, New York, 1967.
- Greenberg, D. M. (ed.): *Metabolic Pathways*, Academic, New York, 3d ed., 1967 to present. Valuable series of volumes with articles on different aspects of intermediary metabolism.
- Gunsalus, I. C., and R. Y. Stanier (eds.): *The Bacteria*, vols. II and III, Academic, New York, 1961. The metabolic classification of microorganisms is described in detail, as are many metabolic pathways.
- Krebs, H. A., and H. L. Kornberg: *Energy Transformation in Living Matter*, Springer-Verlag, Berlin, 1957. A classical and readable analysis of metabolism in terms of energy exchanges; it has had a wide influence.
- Morowitz, H. J.: *Energy Flow in Biology*, Academic, New York, 1968. A theoretical analysis of some profound aspects of bioenergetics.
- Novikoff, A. B., and E. Holtzman: *Cells and Organelles*, Holt, New York, 1970.
- Roodyn, D. B. (ed.): *Enzyme Cytology*, Academic, New York, 1967. The intracellular location of various enzymes and enzyme systems.
- Stanbury, J. B., J. B. Wyngaarden, and D. S. Fredrickson: *The Metabolic Basis of Inherited Disease*, 3d ed., McGraw-Hill, New York, 1972. Comprehensive treatment of genetic aberrations in human metabolism, with excellent reviews of the relevant metabolic pathways.

### 论文

- Siekevitz, P.: "The Turnover of Proteins and the Usage of Information," *J. Theoret. Biol.*, 37: 321—334 (1972).

## 习 题

1. 放射性同位素的衰变是个一级反应,可用下面的关系表示:

$$\log \frac{N_0}{N_t} = \frac{\lambda t}{2.303}$$



$N_0$  是放射性同位素在  $t = 0$  时的原子数,  $N_t$  是时间  $t$  时的原子数,  $\lambda$  是衰变常数, 用单位  $t^{-1}$  表示。放射性同位素的半衰期  $t_{1/2}$  是指放射性同位素的原子数下降至恰好百分之五十时的时间。试以  $\lambda$  表示出  $t_{1/2}$ 。

2. 要直接测定某样品中放射性同位素的原子数是不行的。实际上, 放射性同位素只能用测定比例量(单位时间的衰变数)的方法来检知。这种测定是用 Geiger 计数器或闪烁计数器进行的, 而且常用单位时间中的次数来表示。如果一个含  $^{32}\text{P}$  的样品在计数系统中, 放射性强度为  $1.5 \times 10^6$  次/分钟, 那么, 在刚好一星期以后, 它将为每分钟多少次? (在本题和后面的题目均可参阅表 14-5)。

3. 一个样品, 含有设想的放射性同位素, 放射性强度为 10,000 次/分钟, 在 24 小时后为 6,000 次/分钟。问此放射性同位素的半衰期是多少?

4. 一个含  $^{35}\text{S}$  的样品, 需要多长时间才失去其最初放射性的 95%?

5. 一个含  $^{32}\text{P}$  和  $^{35}\text{S}$  的样品, 放射性强度最初为  $3.52 \times 10^5$  次/分钟, 在恰好 30 分钟以后时为  $2.21 \times 10^5$  次/分钟。问原样品中有多少放射性是由  $^{32}\text{P}$  所引起, 多少是由  $^{35}\text{S}$  所引起?

6. 一种物质的比活性是指单位物质在单位时间内的计数。若向 D-半乳糖溶液加入比活性为  $1.00 \times 10^6$  次/分钟/毫克的  $^{14}\text{C}$  标志的半乳糖 0.1 毫克, 测得所生成的混合物的比活性为  $1.37 \times 10^5$  次/分钟/毫克。那么原样品中半乳糖的浓度是多少?

7. 物质的体积分布 (volume distribution) (“库容 pool size”) 可以用放射性同位素的稀释度来测知。设想有 10 微升  $3.00 \times 10^6$  次/分钟的  $^{24}\text{Na}$  溶液被注射至实验动物的血流中。30 分钟后, 取 50 微升血液进行测定, 为 126 次/分钟。如果设  $\text{Na}^+$  未排泄, 而且也没有透进细胞, 那么  $\text{Na}^+$  的体积分布该是多少?

[方璧岚译 朱定尔校]

## 第十五章 生物能原理与 ATP 循环

在生命状态的分子逻辑学中,细胞可以被看作是在恒温、恒压与恒定容积条件下能够工作的化学机器。像人制造的机器一样,所有活机体必须从周围环境中获得它们的能量供应。光合作用的有机体利用太阳光的辐射能,而异养生物有机体则利用它们从周围所获得的有机营养物质分子结构中所固有的能量。这些能量形式由细胞转变成三磷酸腺苷(ATP)的化学能,ATP 起着能量载体的作用,它将能量运输到细胞中那些需能的过程中去。

本章我们将阐述活细胞的能力学中作为 ATP 体系的功能基础的化学及热力学原理。这些原理对中间代谢的各个方面都是基本的,而且在以后的章节中将要反复强调。

### ATP 循环

ATP 最初是由 C. Fiske 及 Y. Subbarow (美国)及 K. Lohmann (德国)于 1929 年同时在肌肉提取物中发现;随后就认为 ATP 主要参与肌肉收缩。直到 1940 年代初期,许多早期的观察明朗化了,形成一幅有意义的图画,ATP 在所有活细胞中的全部作用就变得很清楚了。有些可以举例如下。在本世纪三十年代就了解(特别是根据德国生物化学家 Otto Warburg 及 Otto Meyerhof 的研究)ATP 是在肌肉中的葡萄糖无氧分解生成乳酸的偶联酶促反应中从 ADP 生成的。后来 H. Kalckar (丹麦)及 V. Belitser (苏联)证明,在动物组织的有氧氧化中通过氧化磷酸化也能从 ADP 生成 ATP。这与 V. A. Engelhardt 的早期学说是符合的。当 Engelhardt 及 M. N. Lyubimova 发现 ATP 被肌球蛋白(肌肉中一种主要收缩蛋白)水解成 ADP 及磷酸时,以及当 C. F. Cori 和 G. T. Cori (美国)及其他研究者认识到葡萄糖磷酸化并因而使葡萄糖“能量化”(energize)以供糖原生物合成的过程也需要 ATP 时,才认识到 ATP 本身确是用于需能的功能的。

1941 年由 Fritz Lipmann 综合这些及其它观察成为活细胞能量转移的一般假说。对此 Kalckar 也作出了重要贡献。Lipmann 提出,无论是从物代谢作用的产生化学能的降解或分解反应到各种需要能量输入的细胞过程,ATP 是以一种循环方式起着化学能载体的作用(图 15-1)。ATP 是通过偶联磷酸化反应消耗燃料分子降解所产生的能量从 ADP 生成的。设想形成的 ATP 又可把它的末端磷酸基供给特异受体分子,为它们在细胞内执行各种需能功能提供能量,例如,细胞大分子生物合成(化学功),无机离子及细胞养料透过膜,对抗浓度梯度的主动运输(渗透功),肌肉收缩(机械功)等。当 ATP 的能量供给了这些需能过程,ATP 被分解成为 ADP 及无机磷酸盐。然后 ADP 又可通过利用燃料氧化产生的能量再磷酸化而生成 ATP,从而完成细胞的能量循环。ATP 的末端磷酸根可以认为是经常地进行更新的,即不断地被转移到受体分子上,并不断地被在细胞燃料的降解过程中“高能化”了的磷酸根所取代。

了解从燃料的氧化到各种需能过程 ATP 在化学能的转移中作为一个分子连接剂



的功能,我们首先必须查明 ATP 的某些化学性质,然后考虑那些控制由化学反应转移的能量的物理原理。

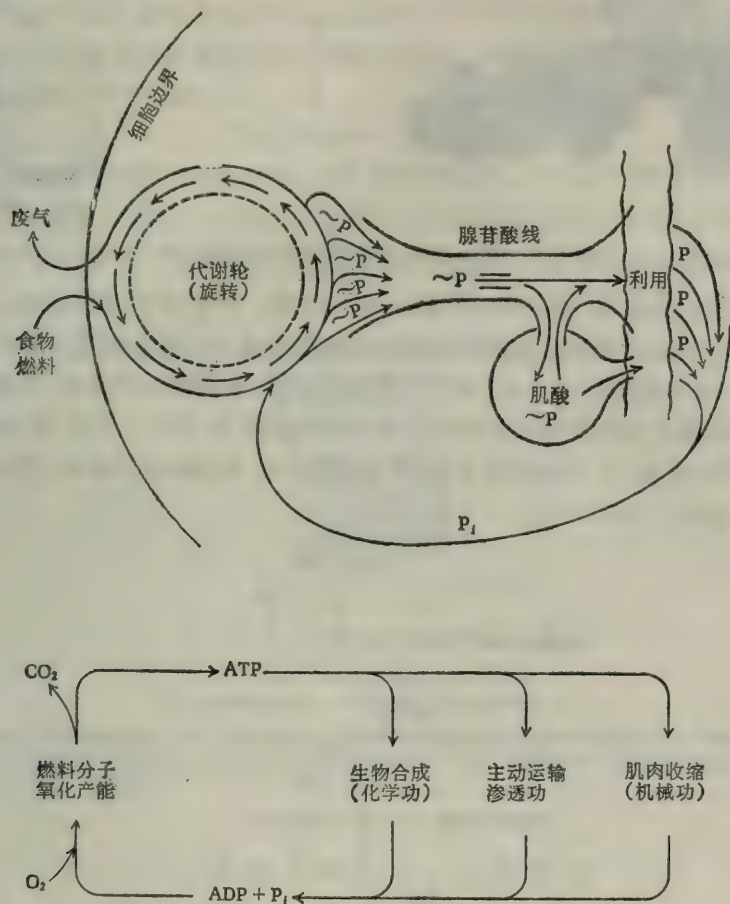


图 15-1 ATP 循环。上图示由 Lipmann 于 1941 年描绘的循环图,按其原语:“代谢发电机产生  $\sim\text{P}$  流,这是由腺苷酸传播,同样地,这种腺苷酸作为电线系统分布这些能流。肌酸  $\sim\text{P}$  参与时,则起着  $\sim\text{P}$  瓶作用” [F. Lipmann, *Adv. Enzymol.*, 1:122 (1941)]。下图表示 ATP 能量的主要用途的转化。

## ATP、ADP 和 AMP 的发现及性质

ATP 的结构(图 15-2)首先由 Lohmann 于 1930 年提出, Alexander Todd 及其共同工作者于 1948 年通过化学合成而最后确定。在动植物界所检查的全部生命形式中,都曾发现有 ATP、ADP 及 AMP。在活细胞水相中它们的浓度的和保持相对恒定,其含量介于 2 到 10 mM 之间,随生物品种而异。在代谢活跃的细胞中,ATP 的浓度常常远超过 ADP 及 AMP 浓度之和。这些核苷酸不仅存在于可溶性细胞质中,而且也分布于细胞器如线粒体及核。后面我们将看到 ATP 在细胞内的隔室分布是细胞代谢调节中是一个重要特征。

在 pH 7.0 ATP 及 ADP 两者都是高电荷的阴离子, ATP 上连接着的磷酸根中有四个可电离的质子; ADP 则有三个。在 ATP 中四个质子中的三个在 pH 7.0 时完全被电

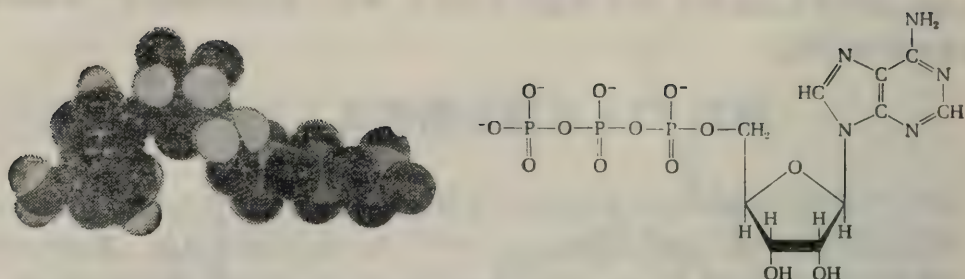


图 15-2 ATP 的实体模型与结构也见于图 12-8

离;第四个  $pK'$  为 6.95, 在 pH 7.0 时约有 50% 可离解。我们将看到围绕着 ATP 的三磷酸根的紧紧靠近的高浓度的负电荷在能量转移功能中是一个重要因素。事实上在完整细胞中 ATP 及 ADP 主要以 1:1  $MgATP^{2-}$  及  $MgADP^-$  络合物形式存在, 因为焦磷酸根对二价阳离子有高亲合力以及在细胞内液中有相当高浓度的  $Mg^{2+}$ 。ATP 对  $Mg^{2+}$  的亲合力大约为 ADP 的 10 倍, 在大多数以 ATP 作为磷酸供给体的酶促反应中, 它的活性形式是  $MgATP^{2-}$  络合物。(图 15 3)

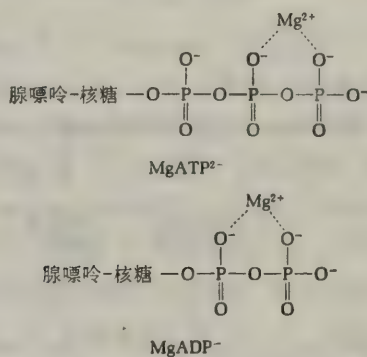


图 15-3 ATP 及 ADP 的金属元素复合物。在  $Mg^{2+}$  复合物中两个末端磷酸根是配位体。

## 自由能

叙述 ATP 在细胞能量循环中的功能的物理化学基础必须考虑到用于化学反应的热力学平衡的某些原理。

热力学第一定律是能量守恒原理: 在任何过程中, 系统及其周围的总能量保持恒定。虽然在一定过程中能量既不能产生又不能消失, 但它可以从一种形式转化成另一种形式; 例如化学能可能被转化成热能、辐射能、电能、或机械能。

热力学第二定律说明在所有过程中系统加环境的熵, 即“宇宙”的熵, 总是增加到获得平衡为止, 在平衡点, 在普通的温度及压力条件下熵是最大可能。熵可以看作一无规则的或任意的名词。换言之, 第二定律说明所有化学的及物理过程的最终动力是宇宙的熵向最大变化。

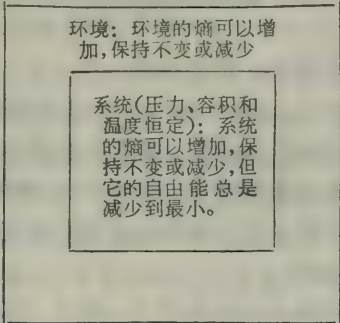
但是, 熵的变化在判断化学反应的方向及平衡位置中其用途是有限的。一方面, 熵往



往不能在化学过程中被直接测定或计算出来。而且,我们不仅必须知道所研究的体系中熵的变化,还必须了解它的环境中熵的变化。已经得出一个比熵变化更有用的可以判断化学反应的方向及平衡位置的指标,此即自由能变化,这种形式的能在恒温恒压条件下能做功。在恒温恒压条件下反应体系的自由能变化和熵之间的关系,象那些在活细胞中存在的那样,可概括为下列方程式

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

方程式中  $\Delta G$  是系统中的自由能变化,  $\Delta H$  是热函变化,  $T$  是绝对温度,  $\Delta S$  是熵的变化。 $\Delta G$  及  $\Delta H$  的能量单位是卡,  $\Delta S$  是卡/度, 温度是开耳芬(Kelvin), 自由能变化  $\Delta G$  是指在恒温、恒压、恒容下系统向平衡进行时总能量变化中用以作功的那部分能量。这些关系概括于图 15-4。

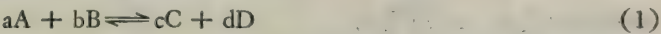


宇宙 = 系统 + 环境: 宇宙的熵总是增加到最大。

图 15-4 当系统的温度、压力、容积恒定时, 系统及其环境之间自由能和熵的关系的概括。系统 + 环境的熵或单独的系统自由能是在这些条件下用作推断化学反应方向的指标。

### 化学反应的标准自由能变化

我们现在将考虑化学反应的自由能变化和它的平衡常数之间的基本关系, 这种关系是生物化学能学的所有方面的基础。设一般反应为:



式中  $a, b, c, d$  是参与反应的 A、B、C 及 D 的分子数目, 在恒温恒压下自由能变化  $\Delta G$  为

$$\Delta G = \Delta G^0 + RT \ln \frac{[C]^c [D]^d}{[A]^a [B]^b} \tag{2}$$

式中方括号表示克分子浓度,  $R$  是气体常数,  $T$  是绝对温度开耳芬,  $\Delta G^0$  是反应的标准自由能变化。

从方程式 (2) 我们注意到一已知化学反应的自由能变化是两个数值之和。第一个数值  $\Delta G^0$  或标准自由能变化是一个固定常数, 其数值对任何给定化学反应来说是具特征性的。它是在任意规定的标准情况下, 当反应进行时, 一给定反应的自由能减少的量度; 这将在下面更准确地给它下定义。第二个数值是一变数, 它反映一给定反应的反应物及产物的浓度。如果已知它的特有的标准自由能变化及反应物与产物的浓度, 则我们便能对在已知温度下的任何化学反应计算出其自由能的变化。

若设反应(1)趋于平衡,此系统的自由能则当趋向平衡时减少,而且理论上在恒温恒压下此反应可以做功。最后系统达到平衡点,此时不会再发生更进一步的净化学变化。在平衡点,系统的自由能在给定条件下是最小的。此时  $\Delta G$  为零,系统也不再能做功。

在平衡点,方程式(2)可写为:

$$0 = \Delta G^0 + RT \ln \frac{[C]^c [D]^d}{[A]^a [B]^b} \quad (3)$$

移项得

$$\Delta G^0 = - RT \ln \frac{[C]^c [D]^d}{[A]^a [B]^b} \quad (4)$$

由于方程式(2)平衡常数  $K'_{eq}$  是

$$K'_{eq} = \frac{[C]^c [D]^d}{[A]^a [B]^b} \quad (5)$$

我们便将  $K'_{eq}$  代入方程式(4)而得到一般方程式

$$\Delta G^0 = - RT \ln K'_{eq} \quad \text{或} \quad \Delta G^0 = - 2.303 RT \log K'_{eq} \quad (6)$$

当气体常数  $R$  用卡作为能量单位 ( $R = 1.98$  卡/克分子/ $K$ ), 则得到的  $\Delta G^0$  为每克分子的卡数。当气体常数是用焦耳作为能量单位 ( $R = 8.31$  焦耳/克分子/ $K$ ) 则得到的  $\Delta G^0$  为每克分子的焦耳数。因此从方程式(6)便能对在任何一定温度下的任何已知反应从平衡常数  $K'_{eq}$  计算出标准自由能  $\Delta G^0$ 。

现在让我们较为准确地给标准自由能变化下一定义,我们将用两种不同的方法,以有助于弄清它的确切的含义。

1. 一已知的化学反应的标准自由能变化是其产物的自由能之和与反应物的自由能之和之间的差,而每一反应物与产物都处于标准状态下。在水溶液中反应成分的标准状态通常规定为浓度  $1.0 M$ , 温度  $25^\circ C$  或  $293^\circ K$ ,  $1$  大气压[在生物化学能学中重量克分子浓度 ( $m$ ) 及克分子浓度 ( $M$ ) 溶液之间的区别并不严格的;但是在所有热力学推导及计算中我们采用克分子浓度 ( $M$ ) ]。每一种化学成分根据它的分子结构都有一特征性的内自由能。所以化学反应的标准自由能变化  $\Delta G^0$  都可用下列方程式表示

$$\Delta G^0 = \sum G^0_{\text{产物}} - \sum G^0_{\text{反应物}}$$

特殊情况反应(1)可写为

$$\Delta G^0 = [cG^0_c + dG^0_d] - [aG^0_a + bG^0_b]$$

2. 标准自由能变化可以用第二种方法加以确定。反应(1)中当  $A$  及  $B$  转变为  $C$  及  $D$  时,标准自由能变化  $\Delta G^0$  相当于每克分子吸收或放出的自由能,并且当转变在标准温度及压力下进行,  $A$ 、 $B$ 、 $C$  及  $D$  的浓度保持为  $1 M$ 。

确切地知道  $\Delta G^0$ ——标准自由能变化及  $\Delta G$ ——实际的或测得的自由能变化之间的不同是极为重要的,这些区别可以用类推法来解释,任何已知化学反应的  $\Delta G^0$  在一定的温度下是一个常数,正如在一定的温度下弱酸的  $pK'$  是一个常数一样。另一方面,  $\Delta G$  是随反应物及产物的浓度变化而变化,正如弱酸溶液的  $pH$  随质子供体与质子受体的浓度变化而变化一样。只有当所有的反应物及产物的浓度都是  $1.0 M$  时,  $\Delta G$  才等于  $\Delta G^0$ , 同样,当质子供体与质子受体都是  $1.0 M$  时,弱酸溶液的  $pH$  才等于它的  $pK'$ 。

$\Delta G$  决定着一个化学反应能否从反应物及产物的已知浓度开始,朝着书写的方向进



行。记住,只有当  $\Delta G$  的符号为负时,即只有当系统的自由能减少时,化学反应才会发生。另一方面,一个标准自由能变化  $\Delta G^0$  为正数的化学反应,只要作用物和产物的起始浓度能使  $\Delta G$  为负数,化学反应仍能按书写方向进行。

当一化学反应在恒温恒压下进行自由能减少,理论上能够做一定的功并在能学上相当于自由能的减少。但是实际上,一个化学反应只有当能以某种方式利用能量时才能做功。化学反应的  $\Delta G^0$  表示理论上它能作的最大功;而实际上所完成的功则是极少或为零,这取决于机械效率或利用能的方式。

### 放能和吸能反应

方程式 (6) 使我们能从任何化学反应的平衡常数计算出它的标准自由能变化  $\Delta G^0$ , 而且平衡常数本身可以从分析测定中估计。假如一反应的平衡常数是 1.0,  $\Delta G^0 = 0.0$ , 并且当 1 克分子反应物 (s) 完全转变成所有浓度为 1 M 的产物 (s) 时,自由能没有变化。假若平衡常数大于 1.0, 则标准自由能变化  $\Delta G^0$  为负值。假若平衡常数小于 1.0 则  $\Delta G^0$  为正值。凡是标准自由能变化为负值的化学反应称为放热反应; 这些反应从所有成分的浓度皆为 1.0 M 开始自发地朝书写的方向进行。标准自由能变化为正值 of 化学反应则称为吸热反应; 它们不能自发地从所有反应物及产物浓度为 1.0 M 开始朝书写方向进行。它们反而朝相反的方向进行。表 15-1 表示标准自由能变化  $\Delta G^0$  和平衡常数  $K'_{eq}$  的大小之间的定量关系。

表 15-1 25° 时平衡常数与标准自由能变化之间的关系

$K'_{eq}$	$\Delta G^0$ , 卡/克分子
0.001	+4,092
0.01	+2,728
0.1	+1,364
1.0	0
10.0	-1,364
100.0	-2,728
1000.0	-4,092

### 生物化学能学中的规定

现在必须详细说明有关生物化学系统的热力学分析的一些规定。

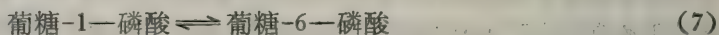
1. 在一稀释的水溶液系统中,无论水是一反应物或产物,它的热力学活性或浓度任意规定为 1.0, 虽然在稀的水溶液系统中,水的实际克分子浓度约为 55.5 M 。
2. 在生物化学能学上,常选定 pH 7.0 作为参比状态,而不是通常物理化学上所用的 pH 0.0 (氢离子活性为 1.0 M)。pH 7.0 时标准自由能变化用  $\Delta G^0$  表示;而在 pH 0.0 时则用  $\Delta G^0$  表示。
3. 用于生物化学能学上的  $\Delta G^0$  值假定每一种能离解的反应物或产物的标准状态是

指在 pH 7.0 时未离解及离解形式的混合物。故以 pH = 7.0 为基础的  $\Delta G^0$  值不一定能适用于 7.0 以外的 pH, 因为一个或多个成分的离解程度会随 pH 的变化而变化。所以 pH 的改变可导致反应中摄取或释放的  $H^+$  及  $OH^-$  离子的数目差异。某些生物化学反应中  $\Delta G^0$  随 pH 的变化是相当大的, 而有时还难于计算。

4. 生物化学系统的标准自由能变化在过去是用卡(或千卡)为单位表示, 但是国际协会最近推荐今后用每克分子焦耳或千焦耳表示(1 卡等于 4.184 焦耳; 1 千卡等于 4.184 千焦耳)。在正文中将采用每克分子千卡表示标准自由能变化, 而在自由能数据表格中则用千卡及千焦耳两种表示方法。

## $\Delta G^{0'}$ 的计算示例

现在可以从催化下列可逆反应的磷酸葡萄糖变位酶的平衡数据示范性地计算标准自由能变化



化学分析表明: 若从 0.020 M 葡萄糖-1-磷酸开始, 加入酶, 让反应转向前的方向进行, 或者从 0.020 M 葡萄糖-6-磷酸开始, 并且反应朝相反的方向进行, 在 25°C 及 pH 7.0 时, 两种情况下的最后平衡混合物都含有 0.001 M 葡萄糖-1-磷酸及 0.019 M 葡萄糖-6-磷酸。然后我们可以计算平衡常数如下:

$$K'_{eq} = \frac{\text{葡萄糖-6-磷酸}}{\text{葡萄糖-1-磷酸}} = \frac{0.019}{0.001} = 19$$

从  $K'_{eq}$  值, 可从方程式 (6) 计算出标准自由能变化  $\Delta G^{0'}$ :

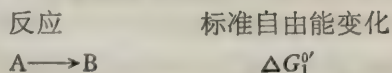
$$\begin{aligned} \Delta G^{0'} &= -RT \ln K'_{eq} \\ &= -1.987 \times 298 \ln 19 \\ &= -1.987 \times 298 \times 2.303 \log 19 \\ &= -1.745 \text{ 卡} (-7.301 \text{ 焦耳}) \end{aligned}$$

假如将气体常数  $R$  的 1.987 卡/克分子/K 值用相当值 8.314 焦耳/克分子/K 值代替, 则方程式 (6) 将直接用焦耳表示标准自由能变化, 即 -7.301 焦耳。

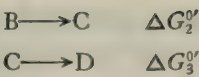
由于生物化学反应的标准自由能变化值的大小用千卡或千焦耳表示较为便当而不用卡或焦耳; 于是上述磷酸葡萄糖变位酶的  $\Delta G^{0'}$  为 -1.745 千卡/克分子或 -7.301 千焦耳/克分子。由于从方程式 (8) 计算的标准自由能变化是负值, 所以从葡萄糖-1-磷酸转变为葡萄糖-6-磷酸是一个放热过程。

## 标准自由能变化的相加性

在任何一序列的连续反应中, 其标准自由能变化都具有相加性, 举例说, 下列连续反应通过共同的中间产物偶联或连接起来; 第一个反应的产物 B 是第二个反应的反应物; 第二个反应的产物 C 是第三个反应的反应物:







这些反应的总和是  $\text{A} \longrightarrow \text{D}$ ，其标准自由能变化  $\Delta G^{\circ'}$  是每步反应的  $\Delta G^{\circ'}$  值的代数和，每一步仍给予原来的符号

$$\Delta G_4^{\circ'} = \Delta G_1^{\circ'} + \Delta G_2^{\circ'} + \Delta G_3^{\circ'}$$

当一反应的平衡常数不能直接测定时，则这一性质在计算反应的标准自由能变化是极为有用的。在这种情况下，可以把反应与已知平衡常数的一个或多个反应偶联起来，使组成一个其总平衡可以容易测得的序列反应。在上例中，如我们已知  $\Delta G_1^{\circ'}$ 、 $\Delta G_2^{\circ'}$  及  $\Delta G_3^{\circ'}$  的数值，便能计算出  $\Delta G_4^{\circ'}$ 。

### 从生成标准自由能计算 $\Delta G^{\circ'}$

得出某一化学反应的  $\Delta G^{\circ'}$  的另一种方法是从其底物和产物的生成标准自由能计算。许多热力学测定结果证明每一类型有机化合物都有一特征性的生成标准自由能  $\Delta G_f^{\circ'}$ ，其定义是在标准状态下及保持固有的定量比例时从其组成生成 1 克分子化合物的自由能减少。许多生物化合物，其生成标准自由能已计算出，列于表 15-2。

表 15-2 1M 水溶液中在 pH 7.0，25°C 时的生成标准自由能

底 物	$\Delta G_f^{\circ'}$	
	千卡/克分子	千焦耳/克分子
乙酸	- 88.99	-372.3
顺-乌头酸	-220.51	-922.61
L-丙氨酸	- 88.75	-371.3
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	- 19.00	- 79.50
L-天冬氨酸	-166.99	-698.69
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	-140.33	-587.14
二氧化碳(气体)	- 94.45	-395.2
乙醇	- 43.39	-181.6
延胡索酸 <sup>2-</sup>	-144.41	-604.21
α-D-葡萄糖	-219.22	-917.21
甘油	-116.76	-488.64
H <sup>+</sup>	- 9.55	- 39.96
OH <sup>-</sup>	- 37.60	-157.3
α-酮戊二酸 <sup>2-</sup>	-190.62	-797.56
乳酸 <sup>-</sup>	-123.76	-517.81
L-苹果酸 <sup>2-</sup>	-201.98	-845.08
草酰乙酸 <sup>2-</sup>	-190.53	-797.18
丙酮酸 <sup>-</sup>	-113.44	-474.63
琥珀酸 <sup>2-</sup>	-164.97	-690.23
水(液体)	- 56.69	-237.2

如考虑反应的实际定量关系，化学反应的  $\Delta G^0$  等于产物的生成标准自由能的和减去反应物的生成标准自由能的和：

$$\Delta G^0 = \sum \Delta G_{f, \text{产物}}^0 - \sum \Delta G_{f, \text{反应物}}^0$$

现在让我们利用上述这种关系式,应用表 15-2 的数据,计算延胡索酸酶所催化的下列反应的标准自由能变化  $\Delta G^{\circ}$ :

$$\begin{aligned} & \text{延胡索酸} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{苹果酸} \\ \Delta G^{\circ} &= \Delta G_{f, \text{苹果酸}}^{\circ} - [\Delta G_{f, \text{延胡索酸}}^{\circ} + \Delta G_{f, \text{水}}^{\circ}] \\ &= -201.98 - [-144.41 - 56.69] \\ &= -0.88 \text{ 千卡/克分子} \end{aligned}$$

虽然这种计算法的误差可能较大,因为  $\Delta G^{\circ}$  值通常代表两项大数间的微小的差别,但这种方式常常是获得一个反应的  $\Delta G^{\circ}$  的唯一方便的途径。注意这种方法计算得出的延胡索酸酶反应的  $\Delta G^{\circ}$  不同于表 15-3 所列从平衡测定所获得的较准确的数值。

表 15-3 在稀水溶液系统中,在 pH 7.0 及 25°C 下某些化学反应的标准自由能变化

反 应	$\Delta G^{\circ}$	
	千卡/克分子	千焦耳/克分子
水解		
酸酐类: 乙酸酐 + H <sub>2</sub> O → 2 乙酸	-21.8	-91.2
焦磷酸 + H <sub>2</sub> O → 2 磷酸	-8.0	-33.4
酯类: 乙酸乙酯 + H <sub>2</sub> O → 乙醇 + 乙酸	-4.7	-19.7
葡萄糖 6-磷酸 + H <sub>2</sub> O → 葡萄糖 + 磷酸	-3.3	-13.8
酰胺类: 谷氨酰胺 + H <sub>2</sub> O → 谷氨酸 + NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	-3.4	-14.2
甘氨酸 + 甘氨酸 + H <sub>2</sub> O → 2 甘氨酸	-2.2	- 9.2
苷类: 蔗糖 + H <sub>2</sub> O → 葡萄糖 + 果糖	-7.0	-29.3
麦芽糖 + H <sub>2</sub> O → 2 葡萄糖	-4.0	-16.7
酯化: 葡萄糖 + 磷酸 → 葡萄糖-6-磷酸 + H <sub>2</sub> O	+3.3	+13.8
重排: 葡萄糖 1-磷酸 → 葡萄糖-6-磷酸	-1.7	- 7.11
果糖-6-磷酸 → 葡萄糖-6-磷酸	-0.4	- 1.67
消去: 苹果酸 → 延胡索酸	+0.75	+ 3.14
氧化: 葡萄糖 + 6O <sub>2</sub> → 6CO <sub>2</sub> + 6H <sub>2</sub> O	-686	- 2,870
软脂酸 + 23 O <sub>2</sub> → 16 CO <sub>2</sub> + 16 H <sub>2</sub> O	-2338	- 9,782

表 15-3 列举了从平衡测定或从生成标准自由能计算出来的一些生物学上重要的反应的标准自由能变化。可注意到当分子氧氧化有机分子时其自由能减少得特别多。这种氧化作用是作为需氧细胞的主要能量来源。

### 磷酸化合物水解的标准自由能

本章剩余的部分将主要讨论在细胞内参与化学能转移的各种磷酸化合物之间的能学关系。为此目的,有必要用一个尺度来表示酶促反应中磷酸根从一个分子转移到另一个分子时的热力学趋向或势能,由此我们能预计这样的磷酸根转移是朝什么方向进行以及反应在什么时候达到平衡。热力学的尺度是比较不同磷酸化合物的磷酸根转移到标准的、任意选定的受体分子(即水)的趋势而建立的。磷酸根从一个供体分子  $\text{R}-\text{O}-\text{PO}_3^{2-}$  转移到水是用下列反应表示:





我们认为这反应实际上是磷酸酯  $R-O-PO_3^{2-}$  的水解。因此，为了得到某些关于在各种生物磷酸化合物中磷酸根的相对转移趋势的概念，我们必须测定它们的水解标准自由能。但首先必须明白生物磷酸化合物在完整细胞内正常是不能进行简单的水解反应的，同时选择水作为标准的磷酸受体以作热力学比较也完全是随意的。

表 15-4 某些磷酸化合物水解的标准自由能

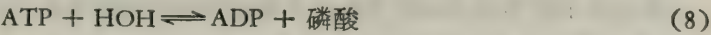
化 合 物	$\Delta G^{\circ}$		磷酸根转移潜力†
	千卡/克分子	千焦耳/克分子	
磷酸烯醇式丙酮酸	-14.80	-61.9	14.8
1,3-二磷酸甘油酸	-11.80	-49.3	11.8
磷酸肌酸	-10.30	-43.1	10.3
乙酰磷酸	-10.10	-42.3	10.1
磷酸精氨酸	-7.70	-32.2	7.7
ATP	-7.30	-30.5	7.3
葡萄糖-1-磷酸	-5.00	-20.9	5.0
果糖-6-磷酸	-3.80	-15.9	3.8
葡萄糖-6-磷酸	-3.30	-13.8	3.3
甘油-1-磷酸	-2.20	-9.2	2.2

† 以  $-\Delta G^{\circ}$  规定(千卡/克分子)

表 15-4 表列细胞内许多重要磷酸化合物,包括 ATP 水解的标准自由能。我们应注意 ATP 的  $\Delta G^{\circ}$  值为  $-7.3$  千卡/克分子 ( $-30.5$  千焦耳),位于各种磷酸化合物能级的中间。我们将看到这些数值是如何测量的。

## ATP 水解的标准自由能

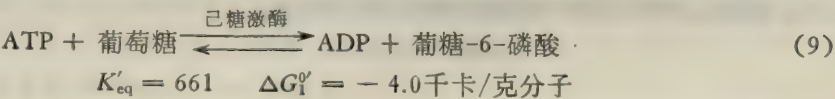
原则上,测定下列反应



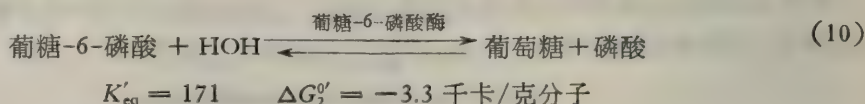
$\Delta G^{\circ}$  最简单的方法是在 pH 7.0 时测定它的平衡常数,根据下列关系式(方程式(6))计算出  $\Delta G^{\circ}$

$$\Delta G^{\circ} = -2.303 RT \log K'_{eq}$$

但是,直接测定 ATP 水解的平衡常数是不现实的,因为在平衡时反应已沿水解的方向进行得很远了,以致现有的分析方法不够灵敏到足以精确地测出在什么时候达到平衡,以及 ATP、ADP 和磷酸的确切的平衡浓度。事实上对于测定具有大负值(或大正值)  $\Delta G^{\circ}$  的任何反应,这是一个严重的实际问题。实际上 ATP 水解的  $\Delta G^{\circ}$ ,我们将写为  $\Delta G^{\circ}_{ATP}$ ,能够利用连续反应的  $\Delta G^{\circ}$  值的相加性推算得到。原则上,相对大的 ATP 水解的标准自由能变化可分为两个或更多的能学上较小的步骤使较为容易测量。例如,在己糖激酶的参与下首先让 ATP 与葡萄糖反应生成 ADP 和葡萄糖-6-磷酸。测定这些反应的平衡常数,并由此计算标准自由能变化



随后就测量葡萄糖-6-磷酸酶所催化的葡萄糖-6-磷酸水解生成葡萄糖和磷酸的反应的平衡常数并计算其标准自由能变化  $\Delta G^{\circ}$ ：



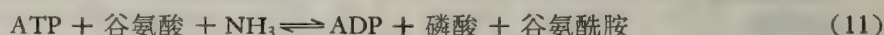
反应(9)及(10)之和就是 ATP 水解的方程式，



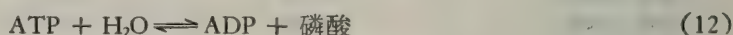
既然这两个反应的  $\Delta G^{\circ}$  值可以相加，就能计算出 ATP 水解的标准自由能：

$$\Delta G_{\text{ATP}}^{\circ} = \Delta G_1^{\circ} + \Delta G_2^{\circ} = -4.0 + (-3.3) = -7.3 \text{ 千卡/克分子}$$

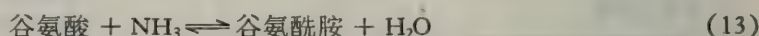
ATP 水解成 ADP 及磷酸时测定  $\Delta G^{\circ}$  的另一方法是由测定反应平衡而得到。



此反应由谷氨酰胺合成酶催化，能分为两个成分。下列反应是产生自由能的放能成分反应



吸能成分需要自由能输入，即：

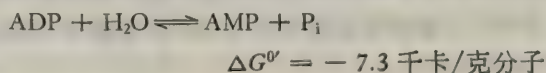


这两个反应之和当然是反应(11)。碰巧反应(13)的标准自由能变化  $\Delta G_2^{\circ}$  已知是 +3.4 千卡/克分子，如果总反应(11)的平衡常数及标准自由能变化  $\Delta G_1^{\circ}$  又能测得，便可以用标准自由能变化相加性的原理计算出反应(12)的标准自由能变化  $\Delta G_1^{\circ}$ 。已经测知总反应(11)的  $\Delta G_1^{\circ}$  是 -3.9 千卡/克分子。ATP 水解标准自由能变化  $\Delta G_1^{\circ}$  便可按下式计算

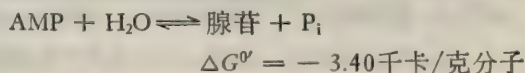
$$\begin{aligned} \Delta G_1^{\circ} &= \Delta G_1^{\circ} + \Delta G_2^{\circ} \\ -3.9 &= \Delta G_1^{\circ} + 3.4 \\ \Delta G_1^{\circ} &= -7.3 \text{ 千卡/克分子} \end{aligned}$$

在各种教科书及研究论文中已发表的 ATP 水解成 ADP 及磷酸的  $\Delta G^{\circ}$  值常有出入，部分由于要测得上面使用的反应平衡常数的精确数值在分析技术上有困难，另外部分是由于不同实验室的测定并不经常是在确实相同的温度、pH 和  $\text{Mg}^{2+}$  浓度等条件下进行的，正如以后可见这其中的每一因素将非常显著地影响 ATP 水解的自由能。在 pH 7.0、25°C 及有 20 mM  $\text{Mg}^{2+}$  存在下 ATP 水解成 ADP 及磷酸的正确  $\Delta G^{\circ}$  值似乎介于 -7 及 -8 千卡/克分子之间。我们在本书前后都将使用数值  $\Delta G_{\text{ATP}}^{\circ} = -7.3$  千卡/克分子 (-30.5 千焦耳/克分子)(见参考文献)。在任何情况下 ATP 作为化学能的中间载体的作用的真正重要性不是  $\Delta G_{\text{ATP}}^{\circ}$  的绝对值有多大，而是将在下面讨论的水解生物上重要的磷酸根供体成 ADP 的  $\Delta G^{\circ}$  值，以及由于将 ATP 末端磷酸根转移到 ATP 循环中(表 15-4)各种受体分子上而生成的磷酸化合物的  $\Delta G^{\circ}$  值与  $\Delta G_{\text{ATP}}^{\circ}$  的相对值的大小。

在 pH 7.0 时 ADP 末端的磷酸根也有一个比较大的水解的标准自由能



但是，AMP 的单一磷酸根则具很低的数值





回顾前述 ATP 及 ADP 的相邻磷酸根之间的键是酸酐键,而 AMP 中磷酸与核糖之间的键是酯键。一般说来,酸酐键比酯键有更大(负的)水解的标准自由能。

## ATP 水解时自由能变化的结构基础

ATP 分子有什么结构特征使它的末端磷酸根在 pH 7.0 比在热力学能级较低(表 15-4)的其它磷酸化合物具有更负的水解标准自由能呢 ( $\Delta G^0 = -7.3$  千卡/克分子)? 为什么 ATP 的水解标准自由能比如说要比葡萄糖-6-磷酸为负呢? 而葡萄糖-6-磷酸水解生成葡萄糖及磷酸的标准自由能仅仅是  $-3.3$  千卡/克分子<sup>-1</sup>? 这就等于问为什么 ATP 在磷酸根的水解平衡时比葡萄糖-6-磷酸更接近水解完全。

这个问题的答案在于作用物与产物的性质,因为水解标准自由能是衡量作用物自由能与产物自由能间的差异的尺度。磷酸离子在 pH 7.0 是一种共振杂化物,在这种共振杂化物中的形式上的双键具有单键的特征,相反的形式上的单键又具有明显的双键的特征。这种共振杂化物比其形式上的结构所表现的要稳定(即具较低的自由能),相差一个数量称为共振稳定能。ATP、ADP、AMP 及各种磷酸化合物中的磷酸根都是共振杂化物,其稳定性因其共振能不同而有差异,这取决于其相邻的功能基的电子排布。当这种化合物水解时,以不同方式表现的共振能发生很大的变化。恰巧,ATP 水解时反应物和产物之间的共振能差异比葡萄糖-6-磷酸水解要大些。但是在 pH 7.0 时,ATP 分子平均有大约 3.5 个相距很近的负电荷,它们彼此强烈地互相排斥。当末端磷酸键被水解时,复合的三磷酸根内的这种电应力的一部分被分离后所生成的产物阴离子  $\text{HPO}_4^{2-}$  及  $\text{ADP}^{3-}$  消除了。因为这些阴离子都是带负电荷,它们彼此间互相排斥,因此不容易再结合形成 ATP。相反,当葡萄糖-6-磷酸水解时,产物之一葡萄糖不带电荷;因而葡萄糖与磷酸分子间不相互排斥,而有较大的再结合倾向。ATP 两个末端磷酸原子有很强的回收电子趋势,于是使磷酸酐键较简单的磷酸酯葡萄糖-6-磷酸更易被水解。反应物与产物中电子排列的差异的另一后果是 ADP 及磷酸较 ATP 本身有更强的水化作用。这是又一个使 ATP 水解更趋完全的因素。

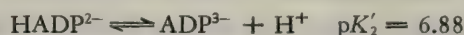
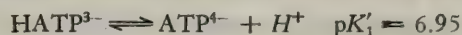
一般说来,酸酐如 ATP 的焦磷酸根及 3-磷酸甘油磷酸的酐基磷酸是具有很大的水解  $\Delta G^0$  负值的高能化合物。其它种类具有极大的  $\Delta G^0$  负值的化合物,包括烯醇酯(磷酸烯醇丙酮酸)、硫酯(乙酰-CoA)及磷酸胍化合物(磷酸肌酸)。在所有情况下是在水解的键中或邻近部位有其特别的电子排布,最终与水解的  $\Delta G^0$  的极大的负值是有关联的。

生物化学工作者有时使用的磷酸键能这个术语不应与物理化学工作者所用的键能术语混淆,后者是指断裂两原子间的键能所需能量。实际上断裂一个共价化学键需要比较大的能量,假若这些键不十分稳定,它们就不会存在。在磷酸酯水解时虽然破坏了一个 P—O 键,但又形成一个新的 P—O 键。磷酸键能是专门指当磷酸化合物水解时,其产物的自由能与反应物的自由能之差。

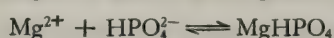
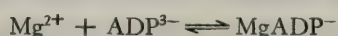
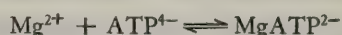
高能磷酸键是指那些水解进行时伴有负  $\Delta G^0$  者,有时用记号 ~ 表示,高能磷酸根写作 ~P,例如 ATP 用  $\text{A—R—P} \sim \text{P} \sim \text{P}$  表示,而 ADP 用  $\text{A—R—P} \sim \text{P}$ ,磷酸肌酸用  $\text{P} \sim \text{Cr}$  表示。

## 对 ATP 水解的 $\Delta G^0$ 有影响的条件

有几个因素能影响 ATP 水解的自由能的大小,图 15-5 中的数据表明,  $\Delta G_{ATP}$  随 pH 增加而急剧上升。这反映了一个事实,即 ATP、ADP 及磷酸最后一步电离的  $pK'_s$  值不同:



有  $Mg^{2+}$  参与也将改变  $\Delta G_{ATP}$  的值。游离型  $ATP^{4-}$ 、 $ADP^{3-}$  及  $HPO_4^{2-}$  可与  $Mg^{2+}$  通过可逆反应形成络合物



但是,游离型  $HATP^{3-}$ 、 $HADP^{2-}$  及  $H_2PO_4^-$  也与  $Mg^{2+}$  形成络合物。由于  $Mg^{2+}$  和六种磷酸化合物中每一种的亲合力都不同,而且其亲合力又随 pH 而增加,显然 pH 及  $Mg^{2+}$  浓度对  $\Delta G_{ATP}$  的影响是极其复杂的。图 15-6 表示在 pH 7.0 时增加  $Mg^{2+}$  浓度对  $\Delta G_{ATP}$  的影响。可以从用计算方法制备的图像中根据任一已知 pH、 $Mg^{2+}$  浓度及离子强度而查得  $\Delta G_{ATP}$  的数值。(见参考文献)

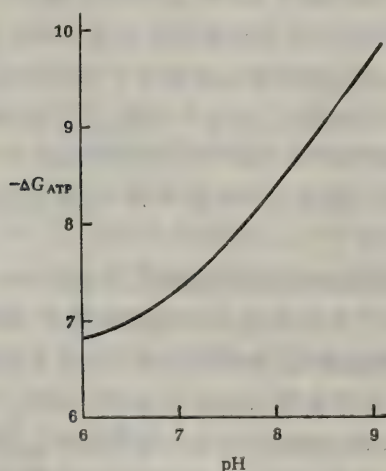


图 15-5 pH 对 ATP 水解的自由能的影响

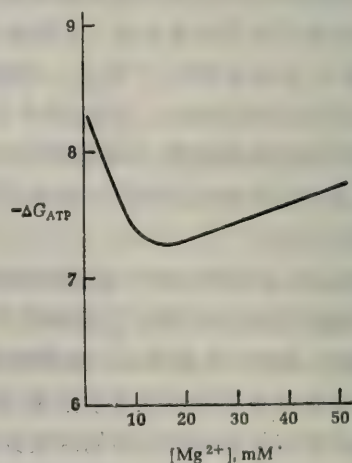


图 15-6 在 pH 7.0  $Mg^{2+}$  浓度对 ATP 水解的自由能的影响

最后, ATP、ADP 及磷酸在完整细胞内的浓度与 1.0 M 标准浓度相差甚远,此标准浓度是测得所有反应的  $\Delta G^0$  值的基础。经过对细胞内 pH、 $Mg^{2+}$  浓度以及在细胞内水相中 ATP、ADP 及磷酸的实际稳态浓度作适当校正后,在完整细胞内 ATP 水解自由能接近 -12.5 千卡/克分子。为了比较各种反应使前后一致,必须使用标准自由能变化  $\Delta G^0 = -7.3$  千卡/克分子,但是非常清楚,假若它们反映细胞内实际情况及过程时,必须对这种计算作相当大的校正。此外,也很明显在细胞内 ATP 水解的标准自由能并不



一定恒定,它可以随时甚至随地而变化,这取决于任何时间地点下的  $\text{pH}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  浓度以及  $\text{ATP}$ 、 $\text{ADP}$ 、磷酸浓度。

## 磷酸根的转移潜力

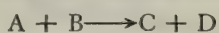
细胞内的磷酸化合物常常按照它们水解时  $\Delta G^0$  值的大小划分为高能或低能化合物。例如,  $\text{ATP}$  通常被划分为高能磷酸化合物。然而对表 15-4 中各种磷酸化合物的  $\Delta G^0$  值是按照负值减少的顺序排列的。可见磷酸化合物不能严格划分为两类。此外有几种磷酸化合物比  $\text{ATP}$  本身具有更大的负  $\Delta G^0$  值。 $\text{ATP}$  在这种热力学尺度中是占一中间数值。在此标准以上的化合物,如 3-磷酸甘油磷酸,比那些在此标准下面的化合物在平衡时水解更完全,因此时有一较大的平衡常数。

在此表中高于  $\text{ATP}$  的任何化合物倾向于失去它的磷酸根到它下面的磷酸受体分子如  $\text{ADP}$  上,假如有催化剂存在能促进磷酸根的转移。同样,  $\text{ATP}$  倾向于将它的磷酸根转移给表中在它下面的受体如 D-葡萄糖。于是此表告诉我们不同磷酸化合物转移磷酸根的热力学倾向或潜力。磷酸根转移潜力 (phosphate-group transfer potential) 这一术语常用于表示磷酸根“压力”;有时用无单位的正数表示,如表 15-4。

在此表中  $\text{ATP}$  具有一中间数值,这一事实有着特殊意义,因为在细胞内多数酶催化的磷酸根转移反应中  $\text{ATP}$  是一个共同的中间产物:  $\text{ADP}$  能够从表中  $\text{ATP}$  以上的磷酸化合物中接受一个磷酸根,而这样形成的  $\text{ATP}$  又能将磷酸根转移到一受体分子上而生成一个位于表中  $\text{ATP}$  以下的磷酸化合物。

## 共同中间产物原理: 偶联反应

在两个连续反应中,第一个反应的产物是第二个反应的底物,如连续反应



这一反应被认为是通过共同中间产物 D 而偶联的。在等温条件下化学上的能量之所以能够从一个反应转移到另一个反应的唯一途径(除非荧光现象)是由于这两个反应都具有这样一个共同中间产物。在细胞内几乎所有代谢反应都是通过这种连续反应方式进行。在通过  $\text{ATP}$  担负着能量转移的连续反应中,化学能从一个高能磷酸根供体转移到  $\text{ADP}$ , 并且作为一个反应产物以  $\text{ATP}$  形式而被贮存起来。在相继反应中,  $\text{ATP}$  又作为底物,它的末端磷酸根又被转移到受体分子上,而使后者变为一个含有高能量的化合物。于是  $\text{ATP}$  是一种共同中间产物,在包括磷酸根转移在内的酶促反应中,它起一连接或偶联作用,因此  $\text{ATP}$  也是化学能转移的一种媒介。实际上,通过共同中间产物的化学能转移是连续化学反应的一般属性,并不一定需要磷酸根或  $\text{ATP}$ 。事实上我们将看到,除磷酸外的许多化学基团,例如氢原子、氨基、乙酰基都是借助于有共同中间产物的连续反应而进行酶促转移。但是在中心的代谢途径中,细胞主要利用磷酸根作为能量的转移。

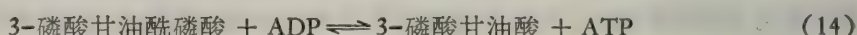
现在让我们更深入地了解发生在下列情况的自由能的变化: (1) 磷酸根从一个供体分子酶促转移到  $\text{ADP}$  及 (2) 从  $\text{ATP}$  酶促转移末端磷酸根到磷酸受体上,以便以更定

量的方式了解到 ATP-ADP 系统在细胞内化学能转移的主流中是如何起着共同中间产物的作用。

## 磷酸根到 ADP 的酶促转移

从代谢的观点来看,有两类普通的高能磷酸化合物,因其水解  $\Delta G^0$  比 ATP 具更大的负值,所以能够起到将磷酸转移至 ADP 的供体作用(表 15-4)。第一类包括 3-磷酸甘油磷酸及磷酸烯醇式丙酮酸,它们是在燃料分子产能的酶促分解时产生的。第二类包括磷酸肌酸及磷酸精氨酸,它们在肌肉中起着化学能贮存库的作用。让我们讨论一下上述两类化合物提供磷酸根给 ADP 的酶促反应。

3-磷酸甘油酰磷酸及磷酸烯醇式丙酮酸二者是在糖酵解中产生的,葡萄糖分解成乳酸这一过程中为肌肉及其它细胞提供了相当大的能量。这些化合物实际上在细胞内并不水解;而是它们的磷酸根被转移到 ADP。如 3-磷酸甘油酰磷酸被 3-磷酸甘油激酶催化,其反应为:



这些反应的标准自由能变化已经从它的平衡常数 ( $K' = 2.070$ ) 计算为  $-4.50$  千卡/克分子。从极大的平衡常数以及比较大的  $\Delta G^0$  负值可清楚地看出,这反应从 1M 反应物及产物开始,将一直向右进行;当达到平衡时,将从 3-磷酸甘油酰磷酸转移磷酸根使 99.9% 以上的 ADP 转变成 ATP。在这过程中伴有从 3-磷酸甘油酰磷酸将化学能转移到 ADP,这种能量是以 ATP 形式保存下来。从表 15-4 的数据注意反应 (14) 的  $\Delta G^0$  值,即

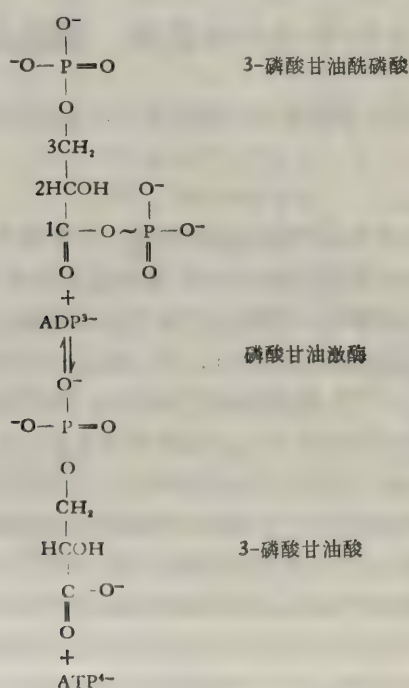
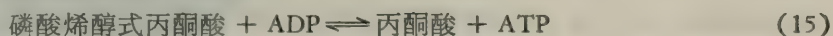


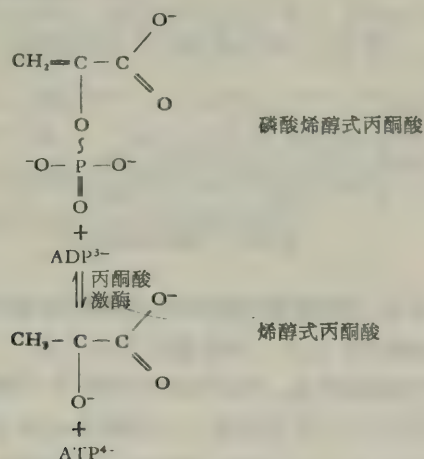
图 15-7 从 3-磷酸甘油酰磷酸到 ADP 的磷酸根转移



与上述极为相似,磷酸烯醇式丙酮酸也是葡萄糖裂解成乳酸时形成的,在丙酮酸激酶催化反应中将它的磷酸根转移到 ADP 上:



实际上这些反应是分两步进行的。(图 15-8)



丙酮酸从醇式非酶促转变成酮式

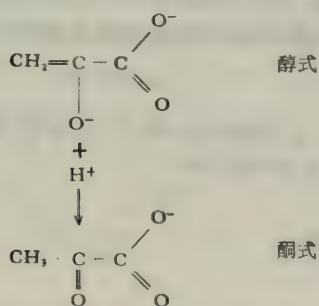


图 15-8 磷酸根从磷酸烯醇式丙酮酸转移到 ADP, 这些反应  $\Delta G^0$  负值大的主要原因是中间产物烯醇式丙酮酸非酶促转变成酮式, 后者在 pH7 时占优势, 表示如上。

在第一步,当磷酸根转移到 ADP 之后形成烯醇式丙酮酸,在 pH 7.0,它能接受质子,并主要通非酶促反应迅速转变为酮式,这一步骤在热力学上起着较大的推动作用。全反应有一非常大的正平衡常数和一个大  $\Delta G^\circ$  负值,即 - 7.5 千卡/克分子,表明在平衡时几乎所有磷酸烯醇式丙酮酸分子都提供它们的磷酸根给 ADP。我们再一次可见到这一反应的  $\Delta G^\circ$  等于磷酸烯醇式丙酮酸的水解  $\Delta G^\circ$  与 ATP 的水解  $\Delta G^\circ$  之差,即  $-14.8 - (-7.3) = -7.5$  千卡/克分子。因此,通过这两种磷酸根转移反应,葡萄糖裂解成乳酸的大量能量被转移到 ADP,并以 ATP 形式贮存,准备用于需能反应。

高能磷酸化合物起着磷酸键能贮存库的作用通常称之为磷酸原(phosphagen),最重要的是存在于脊椎动物肌肉及神经组织中的磷酸肌酸(图 15-9)和存在于无脊椎动物中的磷酸精氨酸。(图 15-10)

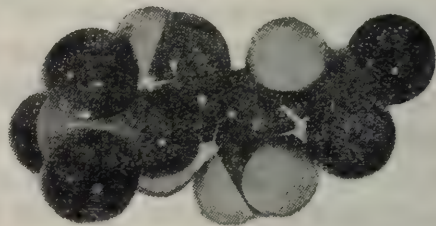
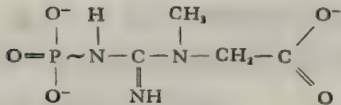


图 15-9 磷酸肌酸的结构及空间填充模式

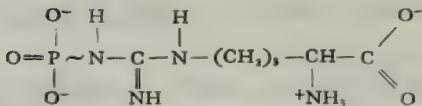
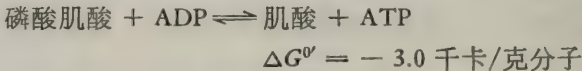


图 15-10 磷酸精氨酸结构

两者的磷原子都直接与胍基上的氮原子连接。其磷酸根分别由肌酸激酶及精氨酸激酶从这些化合物以酶促反应转移到 ADP。磷酸肌酸的反应是



$\Delta G^\circ$  的明显大的负值表明,当从反应物及产物的浓度为 1 M 开始时,这反应也倾向于朝右进行。又可从磷酸肌酸及 ATP 的水解  $\Delta G^\circ$  值预测这反应的  $\Delta G^\circ$ 。

在涉及 ATP 及各种磷酸受体间的磷酸转移酶促反应的机制及通路的许多实验上,

常常使用同位素氧作标志,证明被转移的不是磷酸根  $\left( \text{—O—P} \begin{array}{l} \text{O}^- \\ \text{O} \\ \text{O}^- \end{array} \right)$  而是磷酰基  $\left( \text{—P} \begin{array}{l} \text{O}^- \\ \text{O} \\ \text{O}^- \end{array} \right)$ ,如图 15-11 所示。

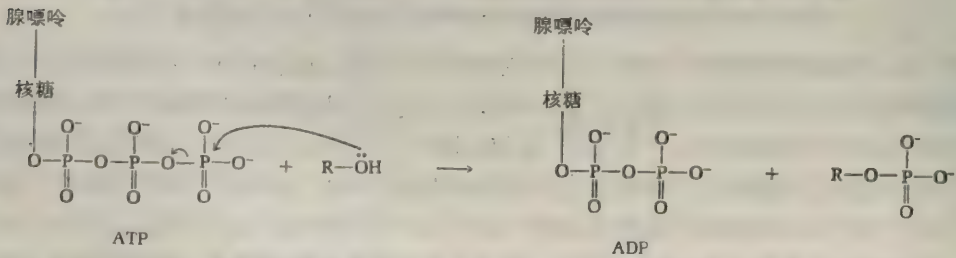
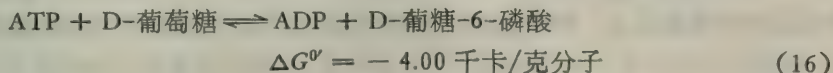


图 15-11 ATP 的末端磷酸根酶促转移到受体 ROH 上。这反应通常是通过磷原子上亲核性置换来进行的,被转移的基团是  $\text{—PO}_3^{2-}$ 。



## 磷酸根从 ATP 到各种受体的转移

在 ATP 发挥能量载体作用的第二个步骤中，它能在特异酶催化反应中将它的末端磷酸根供给各种各样的磷酸受体分子。在这些受体中有 D-葡萄糖及甘油。己糖激酶催化的反应如下：



注意，这反应的  $\Delta G^{\circ}$  是极负的，假若全部反应物及产物的浓度从 1 M 开始，磷酸根倾向于转移到葡萄糖上。因此，在这反应中磷酸根转移的方向是离开 ATP，但是在反应(14)及(15)中则朝向 ADP 生成 ATP。其区别在于从 ATP 转移磷酸到葡萄糖生成磷酸化产物，即葡萄糖-6-磷酸，它的水解标准自由能（见表 15-4）比 ATP 低些（负值小些），但是 3-磷酸甘油磷酸及磷酸烯醇式丙酮酸的  $\Delta G^{\circ}$  值比 ATP 要高些（负值大些）。可见反应(16)  $\Delta G^{\circ}$  值能够从 ATP 的水解  $\Delta G^{\circ}$  值及葡萄糖-6-磷酸的水解  $\Delta G^{\circ}$  值中估计得知（表 15-4）。由此可见 ATP 的末端磷酸根能够转移到许多不同的基本结构单位上，这是一使之“能量化”的过程，并为后续的生物合成反应进行准备。

## 磷酸根转移的酶促途径

图 15-12 是细胞内酶促磷酸转移反应流程图解。一个重要特征是：ATP-ADP 系统是高能与低能磷酸化合物间的主要连接系统，磷酸根首先在特异性的磷酸转移酶作用下从高能化合物转移到 ADP，例如在

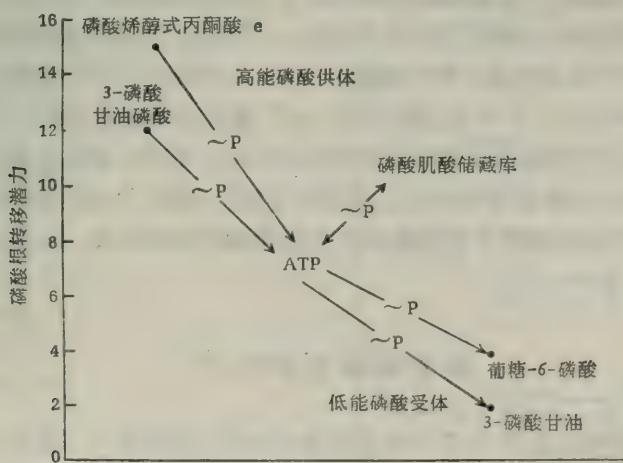
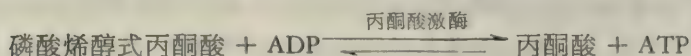
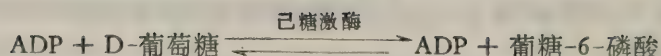


图 15-12 磷酸根从高能磷酸供体经由 ATP-ADP 系统转移到低能受体上，假设在标准状况，所有反应物及产物都是 1 M。流动方向是朝向具低磷酸根潜力的化合物。

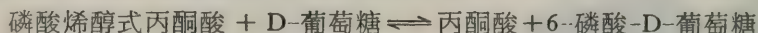


然后形成的 ATP 成为特殊的磷酸供体，在第二个酶促反应中形成一个低能磷酸化合物，

例如在



净结果是通过作为中间媒介的 ATP-ADP 系统磷酸根从高能供体转移到低能受体。总反应是



通过这两步偶联反应，葡萄糖通过它的磷酸化作用转变成一个含高能量的化合物；葡萄糖-6-磷酸可以看作是一种“能量化”了的葡萄糖，它能在糖原及淀粉的需能生物合成中起一种前体的作用。

在几乎所有代谢物间的磷酸转移反应中，如在与上述相似的那些反应中 ADP 起着中间磷酸受体作用，ATP 起着中间磷酸供体作用。

### 酶促反应的标准自由能变化及生物学上的可逆性

在以上讨论中我们已经看到，无论什么时候反应的  $\Delta G^\circ$  具有一相对大的负值，假若反应物及产物的浓度是从 1 M 开始，则反应倾向于朝右，即书写方向进行，精确的平衡位置可以从  $\Delta G^\circ$  值估计。因此我们已经表明磷酸根将从磷酸烯醇式丙酮酸倾向于转移到 ADP，然后从 ATP 转移到葡萄糖。这是因为每一步反应进行都伴有一个负  $\Delta G^\circ$  值，第一步  $\Delta G^\circ = -7.5$  千卡/克分子，第二步为  $\Delta G^\circ = -4.0$  千卡/克分子。事实上这就是在完整细胞内磷酸根的转移方向。

但是，我们不必结论为，由于已知酶促反应的标准自由能变化有一个大负值，在细胞内它是不可逆的。某些具有  $-4.0$  千卡/克分子的  $\Delta G^\circ$  值的酶促反应，譬如己糖激酶催化的反应，从另外的证据中可说明在细胞内基本上是不可逆的，但是具有大抵相同的  $\Delta G^\circ$  值的其它反应在细胞内则能向两者中的任一方向进行。如同曾经指出那样，对化学反应的  $\Delta G^\circ$  值是所有反应物及产物的浓度为 1 M，而实际存在于细胞的浓度却有很大的差异。因此对一个具有  $-4.0$  千卡/克分子的  $\Delta G^\circ$  值的酶促反应  $A \rightleftharpoons B$ ，只要 A 的浓度很低，B 的浓度很高，在细胞内它完全有可能向左进行。例如，假如 A 是经常被其它反应以高速率除去，于是它的浓度保持小至几乎没有，然后 B 能极为迅速地转变成 A。因此个别代谢反应的热力学分析需要了解细胞内有关代谢物的实际浓度，以及它们的生成及利用比率。

### 高能磷酸根的贮存

必须着重强调指出，ATP 主要功能并不是用作化学能的贮存，而是用作能量的传递者或载体。在细胞内任何一定时候 ATP 的含量仅仅在一个短时期内是够用的。但是一些细胞确有用作能量贮存的磷酸化合物，例如磷酸肌酸，图 15-12 指出磷酸肌酸的贮存作用，它是当 ATP 浓度高时通过磷酸根的酶促转移，从 ATP 转移到肌酸而生成的，再没有其它途径生成磷酸肌酸了。而且磷酸肌酸的脱磷酸作用的唯一已知途径是合成反应的逆反应。当 ATP 具高浓度时磷酸肌酸总是贮满了磷酸根。当 ATP 浓度减少时，因而增高



了 ADP 的浓度，磷酸根又从磷酸肌酸转移回到 ADP 上。磷酸肌酸系统在骨骼肌中特别重要，在肌肉中它能提供几分钟收缩所需的化学能（二十七章）。它也存在与平滑肌及神经细胞中，但是在肝脏、肾脏及其它哺乳动物组织中则极少，而在细菌则全没有。在无脊椎动物例如蟹及虾的肌肉中的磷酸精氨酸的功能与上述磷酸肌酸相同。

某些微生物机体以含有多聚偏磷酸的不溶性颗粒方式贮存高能磷酸根，多聚偏磷酸是一种大小不等的线形多聚体(图 15-13)，这些颗粒可用碱性染料特殊染色，常常称之为异染质颗粒。磷根能被特异性酶催化从多聚偏磷酸中释放出来。

### 磷酸根通过其它 5'-三磷酸核苷的渠道

虽然 ATP ADP 系统是细胞内能量转移主流中不可少的磷酸根载体，但是其它核糖核苷及 2-脱氧核糖核苷(十二章)的 5'-二磷酸及 5'-三磷酸也参与细胞的能量转移。各种核糖核苷的 5'-二磷酸及 5'-三磷酸不仅是作为 RNA 合成能量化了的前身，而且也可将高能磷酸根引导参加特殊的生物合成反应(图 15-4)。这些代谢途径都是通过核苷二磷酸激酶的作用与 ATP 连接起来，此酶存在于细胞的线粒体和可溶性胞浆中；它催化图 15-15

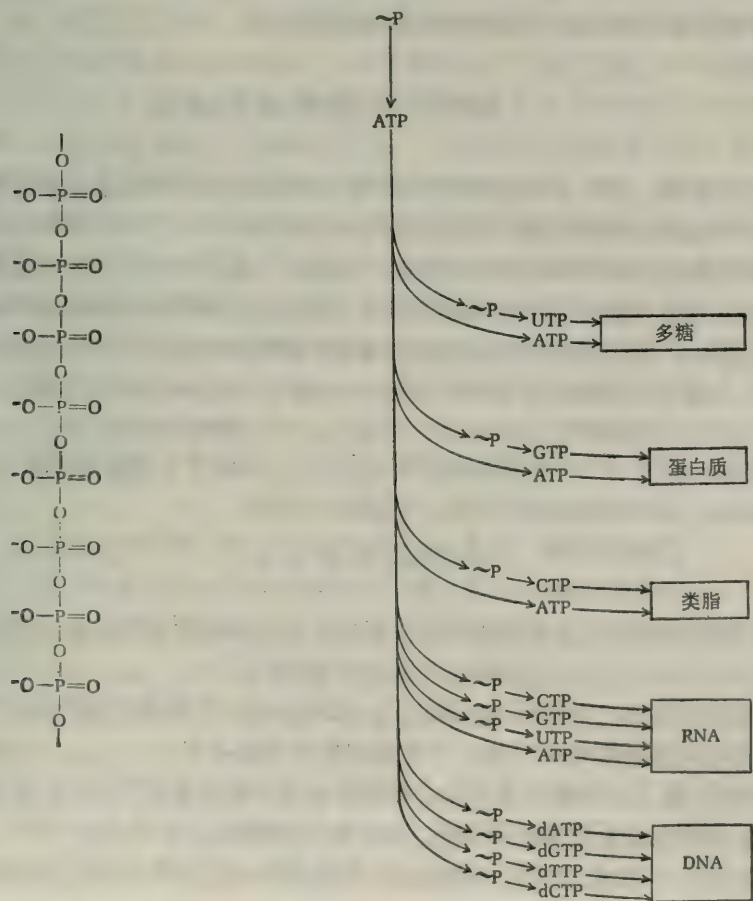


图 15-13 多聚偏磷酸结构

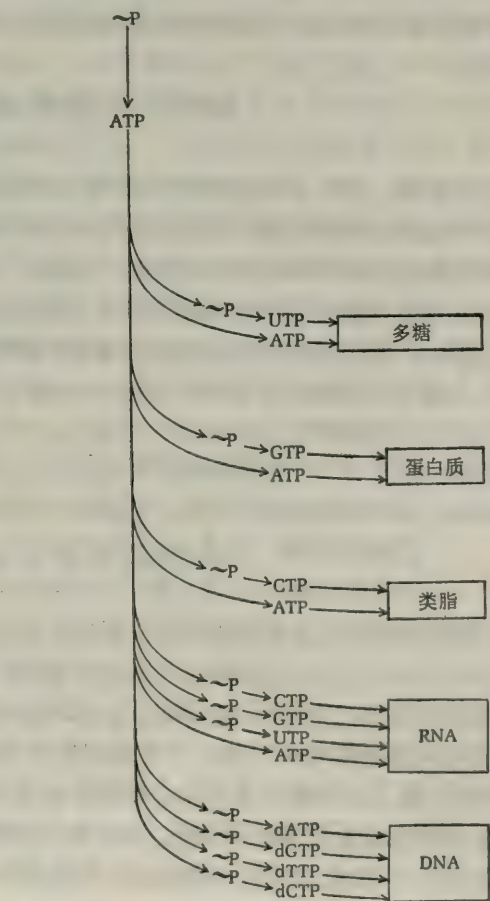


图 15-14 通过 5'-三磷酸核糖核苷和 5'-三磷酸脱氧核糖核苷，高能磷酸根进入各种不同的生物合成的代谢途径。

所示之各种类型的可逆反应。这种酶对它的底物相对地没有特异性。虽然这种反应速率取决于底物的性质,然而它不仅能在 ATP 与任何 NDP 之间转移磷酸,而且也能在任何 NTP 及 NDP 之间转移磷酸。所有这种磷酸根转移的平衡常数在 pH 7.0 时大约是 1.0, 因为所有核糖核苷及脱氧核糖核苷 5'-三磷酸的末端磷酸根的水解自由能大约相同。

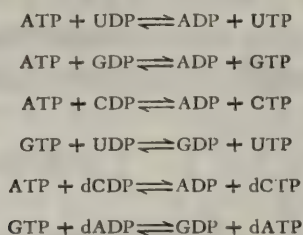
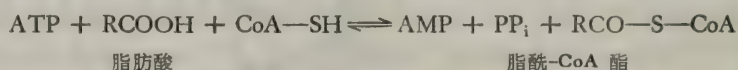


图 15-15 核苷二磷酸激酶催化的反应

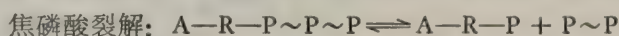
图 15-14 也表明每一种 5'-三磷酸核苷各有一种特殊功能。动物组织中许多合成多糖的反应中三磷酸尿苷 (UTP) 是磷酸根的直接供体 (因而也是能量供体)。同样, 三磷酸胞苷 (CTP) 是脂类生物合成几个反应中能量的供体。图 15-4 也表明 5'-三磷酸脱氧核糖核苷起着使高能磷酸根参与到 DNA 生物合成中去。

## AMP 及焦磷酸的功用

我们已经看到, ADP 是细胞内许多利用 ATP 反应的产物并且是糖酵解和氧化磷酸化产能反应中的直接磷酸受体。但是在细胞内许多利用 ATP 的反应中, ATP 的两个末端磷酸根在酶催化下以焦磷酸形式 ( $\text{PP}_i$ ) 一道脱下, 留下 AMP 作为一反应产物。一个有代表性的反应就是酶促脂肪酸的活化作用, 这反应使脂肪酸与辅酶 A 结合形成酯, 而 CoA 酯是三酯酰甘油及磷酸甘油酯的生物合成中重要的“能量了”的中间产物:



这个反应是通过所谓 ATP 的焦磷酸裂解进行的, 它与通常正磷酸裂解时 ATP 只失去一个磷酸根不同。这两种裂解方式可用下列反应式表示:



当 ATP 的焦磷酸裂解时其自由能的减少实际上比正磷酸裂解要大。下列反应



的标准自由能  $\Delta G^\circ$  为 -10.0 千卡/克分子。因此 ATP 的焦磷酸裂解在一定的酶促反应中, 正如我们将看到的那样会产生一个额外的热力学推动力。

现在问题产生了: 究竟是通过什么机制能从焦磷酸裂解产物 AMP 和焦磷酸再生出 ATP 来呢? 有两个重要的辅助酶能使 AMP 和焦磷酸通过 ATP-ADP 循环又回到磷酸根转移的主流中来, 这就是无机焦磷酸酶及腺苷酸激酶。前者催化无机焦磷酸 ( $\text{PP}_i$ ) 水解成为两分子无机正磷酸 ( $\text{P}_i$ ):





这个反应在进行中自由能大大降低,似乎是浪费了能量,但是我们将会看到焦磷酸的水解有时有助于某一定的生物合成反应的完成。这样形成的正磷酸又能用于从 ADP 再生成 ATP。腺苷酸激酶,有时也称为肌激酶,催化下列反应中 AMP 再磷酸化生成 ADP



腺苷一磷酸激酶也可能使相应的 NMPs 及 ATP 形成其它 NDPs:



但是必须注意 AMP 及其它 NMPs,除非有从其它来源提供某些可利用的 ATP,否则它们就不能再磷酸化。

## 细胞内磷酸根转换的动力学

在完整的活细胞中,短时期内 ATP、ADP 及 AMP 的恒态浓度相对地稳定。正常 ATP 比 ADP 及 AMP 的浓度高很多,这表明腺苷酸系统在正常时几乎被磷酸根“饱和”。假若给细胞突然施加一做功负载,它必须在一个时期内以比平常更快的速率利用 ATP,细胞内 ATP 的浓度将首先减少,而 ADP 的浓度将增加。这种变化是加速糖酵解及呼吸作用的生成 ATP 的反应的信号,这些反应以较高的速率进行并与 ATP 脱磷酸的速率并驾齐驱。当做功的负载突然从细胞除去,ATP 浓度则又急剧增加,ADP 浓度下降,于是这信号又指示生成 ATP 反应使之放慢进行。然而一般来说,细胞内 ATP 生成的速率被调节到与 ATP 利用的速率处于动态稳定状态。我们将在别处看到 ATP 合成的调节可能是通过变构酶的作用而实现的,变构酶的调节物就是 ATP、ADP 或 AMP。

这些情况说明了 ATP 的末端磷酸根在细胞内的更新是极为迅速的,即它必须迅速脱去又同样迅速地复原。这种推测已用放射性同位素磷作标记物而加以证明。导入用<sup>32</sup>P 标记的无机磷到细胞内,随即标记的磷酸极为迅速地被结合到细胞内 ATP 的末端磷酸根上;在一个很短的时间内末端磷酸根和无机磷酸库的比放射性达到相同。事实上,细胞内 ATP 的末端磷酸根的转换率很快,以致不易测得。在呼吸迅速的细菌细胞内,例如大肠杆菌,计算其 ATP 更新的半衰期是以秒计,而在较大的呼吸较缓慢的真核生物细胞,如肝细胞,则大约为 1 到 2 分钟。

## 开放系统的能学

本章中我们用来分析孤立的化学反应中能量变化的经典热力学的或平衡热力学的原理,只能应用于密闭系统,这一系统与其周围环境没有物质交换。分析密闭系统比较简单,因为我们只要考虑在达到平衡后某一给定系统或物质的集合的始态和终态。从这种探讨中许多重要资料可用之于个别酶促反应能学上。但是当我们应用这些资料去分析完整活细胞的能量交换时,就遇到很大困难,因为活细胞是一开放系统;它们与其周围环境有物质交换。此外,细胞从来也不可能达到平衡。活细胞在一给定瞬间都以稳态存在,在稳态中物质的摄入速率等于物质的排出速率。在这种稳态中细胞的所有成分的浓度包括 ATP 都保持稳定;在这些情况下,每一种成分的生成率准确地等于它的利用率。

分析开放系统稳态的能量交换的大小及效率比密闭系统要复杂得多,但为了分析开

放系统从热力学理论的引伸已发展一种称为非平衡的或不可逆的热力学。这些原理的应用不属于本书的范围,但至少稳态的开放系统有两个一般属性在生物学上有着相当大的意义。在稳态下的开放系统所以能做功正是因为它远离平衡状况;而已达到平衡的系统不能做功。此外,只有远离平衡的过程才能被调节。但是最重要的含义在于:在非平衡热力学的形式里,稳态是所有顺利运转的机械的一个特征,可以把它看作是一个开放系统的有规则的状态,在这种状态下产生熵的速率最小,并且在最普通的情况下系统以最大的效率工作。这种关系的意义已经由一个把非平衡热力学运用到生物学上来的早期研究者 A. Katchalsky 作过适当的评论。

这个重要的结论对有关活机体的知识作了新的阐明。生命就是对产生熵的倾向的不断斗争。大的和富于信息的大分子的合成、结构复杂的细胞的形成、组织结构的发生、所有这些都是对抗熵的强大力量。但是由于没有可能在热力学第二定律下逃脱所有自然现象的熵,活机体选择了最不坏的方式——它们通过保持稳态使熵产生的速度达到最低。

## 摘 要

化学反应的能量变化可根据热力学第一和第二定律作定量分析。化学反应过程朝这样的方向以使在平衡时系统加上环境的熵  $S$  为最大,而系统单独的自由能  $G$  为最小。当所有反应物和产物浓度为  $1\text{ M}$ ,  $\text{pH}$  为  $7.0$ , 在标准温度和压力下每个化学反应都有一个特征性的标准自由能变化  $\Delta G^\circ$ ,  $\Delta G^\circ$  可从反应的平衡常数用方程式  $\Delta G^\circ = -2.303\text{ RT log } K'_{eq}$  计算出来。标准自由能变化也能从一系列连续反应的平衡数据或者从反应物和产物的标准生成自由能差计算出来。在有  $20\text{ mM Mg}^{2+}$  存在下,  $\text{pH}$  为  $7.0$  及  $25^\circ\text{C}$  时,  $\text{ATP}$  水解成  $\text{ADP}$  和磷酸的  $\Delta G^\circ$  是  $-7.30$  千卡/克分子。这个相对的负值是由于下列种种因素的结果,包括水解产物、 $\text{ADP}^{3-}$  及  $\text{HPO}_4^{2-}$  之间的静电排斥,他们的共振稳定性和充分水化的倾向性,以及在  $\text{ATP}$  中磷酸根的回收电子的性质等。 $\Delta G^\circ_{\text{ATP}}$  随  $\text{pH}$  及  $\text{Mg}^{2+}$  浓度而变化。在细胞内的条件下,  $\Delta G^\circ_{\text{ATP}}$  约为  $-12.5$  千卡/克分子。某些磷酸化的化合物如磷酸烯醇式丙酮酸和 3-磷酸甘油磷酸,它们都是由糖酵解产生的,它们的水解  $\Delta G^\circ$  值比  $\text{ATP}$  更加负得多,而其它如葡萄糖-6-磷酸则有比较正的数值。在磷酸键能的热力学的标准中  $\text{ATP}$  所处的中间位置以及以  $\text{ADP}$  或  $\text{ATP}$  分别作为磷酸根受体或供体的磷酸根转移酶的特异性,都表明  $\text{ADP-ATP}$  系统是不可少的共同中间物或载体,通过它使分解代谢中产生的高能磷酸化合物的磷酸根转移到某些磷酸受体,并使之能量化。磷酸肌酸、磷酸精氨酸以及多聚偏磷酸是高能磷酸根的贮存库。

当在生物合成反应中  $\text{ATP}$  被利用时,失去一个正磷酸根或一个焦磷酸根而分别生成  $\text{ADP}$  或  $\text{AMP}$ 。 $\text{AMP}$  通过腺苷酸激酶反应  $\text{ATP} + \text{AMP} \rightleftharpoons 2\text{ADP}$  而重新磷酸化形成  $\text{ADP}$ 。其它 5'-三磷酸核苷如  $\text{GTP}$ ,  $\text{UTP}$ ,  $\text{CTP}$ ,  $\text{dATP}$ ,  $\text{dTTP}$  等,也参与作为高能磷酸根载体,通过它们引导进入特定的生物合成途径。在完整的进行呼吸的细胞里,  $\text{ATP}$  末端磷酸根极为迅速地被无机磷酸替换。与环境交换物质和能量的活细胞是开放系统,它们以远离平衡的稳态存在。



## 参 考 文 献

### 书籍

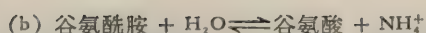
- Blum, H. F.: *Time's Arrow and Evolution*, Harper, New York, 1962. An interesting discussion of entropy in biology.
- Bray, H. G., and K. White: *Kinetics and Thermodynamics in Biochemistry*, 2d ed., Academic, New York, 1966.
- Florkin, M., and E. H. Stotz (eds.): *Bioenergetics*, vol. 22 of *Comprehensive Biochemistry*, American Elsevier, New York, 1967.
- Kalekar, H. M.: *Biological Phosphorylations: Development of Concepts*, Prentice-Hall, Englewood Cliffs, N.J., 1969. A collection of reprinted papers describing classical investigations in bioenergetics, with an accompanying narrative.
- Kaplan, N. O., and E. P. Kennedy (eds.): *Current Aspects of Biochemical Energetics*, Academic, New York, 1966. A volume of essays and papers dedicated to Fritz Lipmann.
- Katchalsky, A., and P. F. Curran: *Non-Equilibrium Thermodynamics in Biophysics*, Harvard University Press, Cambridge, Mass., 1965.
- Krebs, H. A., and H. L. Kornberg: *Energy Transformations in Living Matter*, Springer-Verlag, Berlin 1957. A classical analysis of the energetics of metabolism.
- Lehninger, A. L.: *Bioenergetics*, 2d ed., Benjamin, Menlo Park, Calif., 1972. Elementary treatment stressing biochemical aspects.
- Lipmann, F.: *Wanderings of a Biochemist*, Wiley-Interscience, New York, 1971. Scientific autobiography and some biochemical essays.
- Van Holde, K. E.: *Physical Biochemistry*, Prentice-Hall, Englewood Cliffs, N.J., 1971.
- Wall, F. T.: *Chemical Thermodynamics*, Freeman, San Francisco, 1965. A standard textbook of equilibrium thermodynamics.
- Wood, W. B., J. H. Wilson, R. M. Benbow, and L. E. Hood: *Biochemistry: A Problems Approach*, Benjamin, Menlo Park, Calif., 1974. Chapter 8 contains additional problems and review in bioenergetics.

### 论文

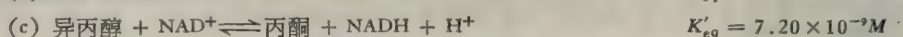
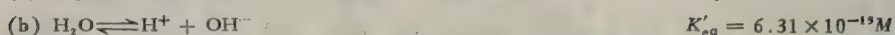
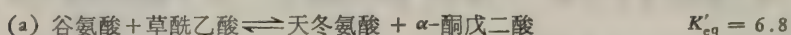
- Alberty, R. A.: "Effect of pH and Metal Ion Concentration on the Equilibrium Hydrolysis of Adenosine Triphosphate to Adenosine Diphosphate", *J. Biol. Chem.*, **243**: 1337—1343 (1968). Important paper on the effect of pH and  $Mg^{2+}$  on  $\Delta G^{\circ}$  of ATP hydrolysis.
- Benzinger, T. H.: "Thermodynamics, Chemical Reactions, and Molecular Biology." *Nature*, **229**: 100—102 (1971). Important theoretical article.
- Ingraham, L. L., and A. B. Pardee: "Free Energy and Entropy in Metabolism," in D. M. Greenberg (ed.), *Metabolic Pathways*, 3d ed., vol. 1, pp. 2—45, Academic, New York, 1967. Excellent review article.
- Jencks, W. P.: "Free Energies of Hydrolysis and Decarboxylation," p. J181 in *Handbook of Biochemistry*, 2d ed., Chemical Rubber Co., Cleveland (1970). Authoritative compilation of thermodynamic data, the source of many values used in this book.
- Lipmann, F.: "Metabolic Generation and Utilization of Phosphate Bond Energy," *Adv. Enzymol.*, **18**: 99—162 (1941). Classical statement of the ATP-ADP cycle.
- Rosing, J., and E. C. Slater: "The Value of  $\Delta G^{\circ}$  for the Hydrolysis of ATP," *Biochim. Biophys. Acta*, **267**: 275—290 (1972).
- Shikama, K., and K-I. Nakamura: "Standard Free Energy Maps for the Hydrolysis of ATP as a Function of pH and Metal Ion Concentration," *Arch. Biochem. Biophys.*, **157**: 457—463 (1973).

## 习 题

1. 试计算在肌肉细胞内液的 pH (pH 6.0) 时 (a) ADP 的第三个可离解质子, 与 (b) ATP 第四个可离解质子的离解百分数。
2. 试从表 15-2 上列出的反应物与产物的标准生成自由能的数据, 计算出葡萄糖生酵发酵 ( $D\text{-葡萄糖} \rightleftharpoons 2\text{乙醇} + 2\text{CO}_2$ ) 的  $\Delta G^{\circ}$  数值。
3. 试运用表 15-33 的  $\Delta G^{\circ}$  值计算下列反应在 pH = 7.0 和 T = 25°C 的平衡常数:  
(a) 葡萄糖-6-磷酸 +  $H_2O \rightleftharpoons$  磷酸 + 葡萄糖



4. 从给定的平衡常数 (pH 7.0), 试计算下列反应在 25°C 时的标准自由能变化:



5. 设 ATP 与 ADP 以等克分子浓度存在, 而磷酸浓度为 (a) 1.0 M, (b) 0.1 M, (c) 0.01 M, (d) 1.0 mM, 试计算 ATP 水解成 ADP 和磷酸的  $\Delta G'$  (pH 7.0; T = 25°C)。

6. 在存在于静止肌细胞内的条件下, 即: ATP = 5.0 mM, ADP = 0.5 mM,  $P_i = 1.0 \text{ mM}$ , pH = 6.0 及 T = 25°C, 试从表 15-5 中的数据开始计算 ATP 水解的自由能。

7. 葡萄糖-1-磷酸经两个连续反应转变成果糖-6-磷酸



运用表 15-3 中  $\Delta G^{\circ'}$  值, 试求总反应的  $\Delta G^{\circ'}$  值。

8. 若延胡索酸的浓度为 10 mM, 在 pH = 7.0 和 T = 25°C 时, 为使延胡索酸酶反应 (苹果酸  $\rightleftharpoons$  延胡索酸 +  $\text{H}_2\text{O}$ ) 向右进行, 问所必需苹果酸的最小浓度是多少?

9. 反应: 磷酸烯醇式丙酮酸 + ADP  $\rightleftharpoons$  丙酮酸 + ATP 的标准自由能变化为 -7.50 千卡。假若磷酸烯醇式丙酮酸和 ADP 的原来起始浓度为 10 mM, 但没有 ATP 或丙酮酸存在, 问产物和反应物的平衡浓度是多少? 又设反应开始时有 6.0 mM ADP、6.0 mM 磷酸烯醇式丙酮酸和 6.0 mM ATP, 试重复上项计算。

10. 用磷酸甘油激酶, 丙酮酸磷酸激酶和催化量的 ATP, 与 30 mM 磷酸甘油磷酸和 10 mM 丙酮酸的混合物在 pH 7.0 保温直至达到平衡。试计算平衡时磷酸烯醇式丙酮酸的浓度。

11. 腺苷酸激酶催化下列反应:



$$\Delta G^{\circ'} = +0.486 \text{ 千卡/克分子}$$

- (a) 设 ATP 的浓度为 4.90 mM, 并假定腺苷酸激酶反应是达到平衡以及腺嘌呤核苷酸浓度为 5.00 mM, 计算 ADP 及 AMP 的浓度。

- (b) 假若 ATP 的浓度从 (a) 减少 10%, 试问 (a) 中 AMP 浓度变化的百分率是多少?

[黄耀辉译 朱定尔校]



## 第十六章 糖 酵 解

现在我们开始讨论催化燃料分子降解,以及以 ATP 形式回收其部分化学能的多酶系统。我们将首先研究糖酵解,即葡萄糖无氧降解生成乳酸。糖酵解是几种分解代谢途径中的一种,通常称为无氧发酵。在缺乏分子氧的情况下,许多有机体就是通过这一途径从各种有机燃料中提取化学能的。有生命的机体最初发生在缺氧的大气中,因此无氧发酵是生物从养料分子获得能量的最原始的生物学机制。大多数较高等的有机体保留着使葡萄糖无氧降解为乳酸的能力,并已成了葡萄糖有氧分解的一个准备途径。此外,糖酵解还是大多数动物在无氧可利用时短期产生能量的一种重要的应急机制。

糖酵解途径是第一个被阐明的主要的酶系统。在二十世纪的上半世纪,它曾吸引了一些最有成就的生化学家的注意。在糖酵解的研究中所受的教益,为我们对酶学和中间代谢研究提供了新见识和打开了新的门径。我们将相当详尽地研究糖酵解过程,因为它将作为研究其它多酶系统和代谢途径的一个原型。

### 发 酵 和 呼 吸

所有的异养型有机体,最终是从氧化还原反应获取它们的能量的。那就是说,在这些反应中,电子从一种化合物——电子供体或还原剂转移到电子受体或氧化剂上。需氧机体从呼吸获得其大部分能量。呼吸就是用分子氧氧化有机燃料,因此在呼吸过程中,氧就是最终的电子受体。厌氧异养体亦从氧化还原反应获得其大部分能量,但是在这里电子是从糖降解的一种有机中间产物(电子供体)转移到发酵过程中的另一有机中间产物(起电子受体作用)上的。在无氧发酵过程中燃料实际上并没有被氧化。

能够在无氧状态下生存的,也就是能够利用发酵作为能量来源的有机体可分两类:一是必须或严格厌氧菌,完全不能利用氧,而且往往不能耐受氧。它们包括生活在海底泥漿的细菌、泥土中将硝酸盐还原为氮的反硝化细菌、能产生甲烷——形成沼气的细菌,以及某些使人致病的有机体,如泥土中使伤口感染产生气性坏疽的梭状芽胞杆菌和与致死型食物中毒有关的肉毒杆菌。另一类是兼性厌氧菌,在有氧或无氧时都能生存。当它们在无氧条件下生存时,它们从发酵过程获得能量。当它们在有氧条件下生存时,它们往往通过无氧途径继续降解其燃料,然后消耗分子氧(图 16-1),以氧化无氧途径的产物。

无氧发酵的最普通的燃料是糖,特别是 D-葡萄糖,但有些细菌根据其种族不同,能以脂肪酸、氨基酸、嘌呤、嘧啶为燃料分子进行无氧发酵获得其代谢能量。事实上,微生物的分类就是部分地依据其有机燃料和发酵产物的特点划分的。

在许多种葡萄糖发酵中有两种密切相关的类型占着优势(图 16-2)。在糖酵解(有时叫同型乳酸发酵)中,唯一的终产物是由 6-碳葡萄糖分子降解产生的两分子 3-碳乳酸。此型葡萄糖裂解见于多种微生物及多数高等动植物细胞内。在酒精发酵中葡萄糖分子分裂为两分子 2-碳化合物——乙醇( $C_2H_5OH$ )和两分子  $CO_2$ 。这是许多酵母的特点。酒

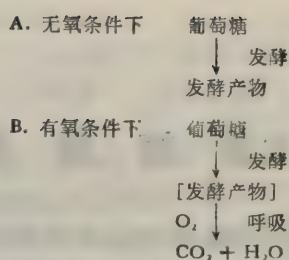
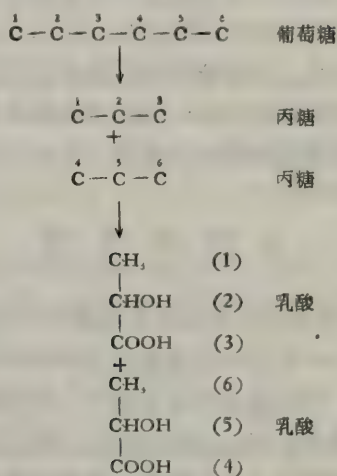


图 16-1 兼性有机体(包括多数较高等动植物)内葡萄糖的利用型式  
发酵是葡萄糖无氧(A)和有氧(B)利用的共同途径

精发酵和糖酵解有相同的酶促途径,但是到最后则需要两个不同的酶促步骤(图 16-2)。葡萄糖发酵的其他类型大部分是糖酵解基本途径的变式。

A. 糖酵解 葡萄糖 → 2 乳酸



B. 酒精发酵 葡萄糖 → 2 乙醇 + 2 CO<sub>2</sub>

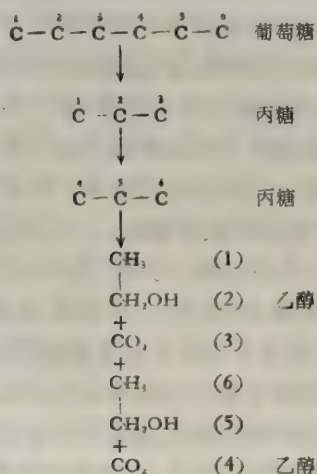
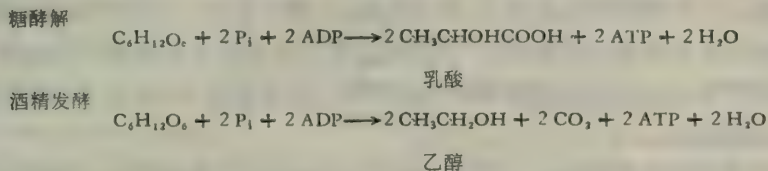


图 16-2 糖酵解(A)和酒精发酵(B)中碳原子的途径,括弧内的数字表示 D-葡萄糖上的碳原子,它们衍生成为产物上的碳原子。



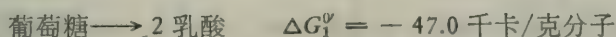
## 糖酵解和酒精发酵的平衡表

图 16-2 所列的糖酵解和酒精发酵途径只是描述了葡萄糖的碳原子的去向,并未涉及这一过程的能量学。事实上,在糖酵解和酒精发酵过程中都从 ADP 和磷酸生成了 ATP。糖酵解和酒精发酵的完全平衡方程式包括能量储存步骤在内为:

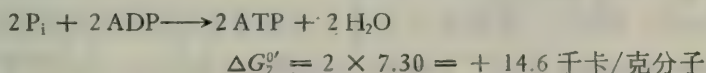


为了分析标准状态下糖酵解的能量学,可将总方程式分解为两个过程。其中葡萄糖变为乳酸是放能过程,而 ADP 和磷酸形成 ATP 是吸能过程:

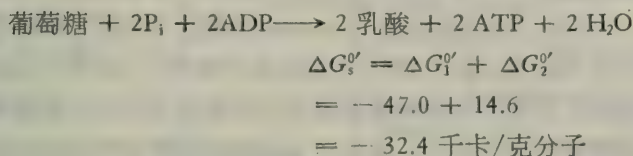
放能过程



吸能过程:



总和:



从标准自由能的变化可以清楚地看到葡萄糖分解为乳酸 ( $\Delta G_1^{\circ'} = -47.6$  千卡/克分子) 所供给的能量比两分子 ADP 磷酸化为 ATP 所需要的能量 ( $\Delta G_2^{\circ'} = +14.6$  千卡/克分子) 要多。因此,葡萄糖分解为乳酸所减少的自由能有  $14.6/47.0 \times 100$  或约 31% 以 ATP 的方式储存起来了。这种计算是以 1.0 M 标准浓度为基础的。如果我们根据细胞内反应物和产物的实际浓度校正上述计算,则实际上糖酵解的真正效率要比 31% 高得多。

就整个糖酵解过程而言,即使扣除通过偶联方式形成 ATP 所需要的能量,仍有非常大量的自由能在实际减少 ( $-32.4$  千卡/克分子)。因此,糖酵解实质上是一个“不可逆”的反应,其平衡大大地趋向于乳酸形成的方向。但是下面我们将会看到,这一反应中的大多数步骤却有着比较少量的标准自由能变化,而且还可以利用这些步骤的逆过程,由乳酸或其他前身物生物合成葡萄糖。

## 实 验 史

糖酵解和酒精发酵的酶促途径是经过多年的研究才被阐明的。有些重要的划时代的事件将说明在这一基本代谢途径的研究中实验与概念上取得的进展。

我们回忆 E. Buchner 的发现,1897 年他发现酵母提出物过滤去除完整细胞后,仍保

留使葡萄糖发酵成为乙醇的能力。这一发明证明,与过去巴斯德的言论相反,发酵酶类可以脱离细胞结构独立地发挥作用。第二个主要的划时代的事件是 1905 年 A. Harden 和 W. J. Yowng 在英国的发现。他们发现用酵母提出物作酒精发酵时需要磷酸,并发现在某些情况下,正在用酵母提出物进行发酵的溶液中有二磷酸己糖聚积,但在其他情况下则又被利用掉。这提示二磷酸己糖是整个发酵过程中的一个中间产物。这一中间产物后来鉴定为 1,6-二磷酸果糖。Harden 和 Young 还发现进行酒精发酵需要酵母提出物中的两个成分参加。一个是不耐热的成分,称酒化酶,大概含有这一过程所需要的酶类;另一个是为酒化酶活性所需要的耐热成分(辅酶)。以后又证明了耐热部分包括两个主要成分,即下文将要讨论的氧化还原辅酶烟酰胺腺嘌呤二核苷酸或 NAD 以及腺嘌呤核苷酸 ADP 和 ATP 的混合物。

另一组重要的观察揭示出,正在用酵母提出物进行发酵的溶液中加入抑制剂氟化物时,出现 3-磷酸甘油酸和 2-磷酸甘油酸这两种磷酸酯的堆积。另一方面,抑制剂碘醋酸则引起 1,6-二磷酸果糖的堆积。一旦鉴定了这些中间产物就可以研究形成和利用这些中间产物的酶促反应。

这些对酵母提出物的基本观察,以及随后关于肌肉提出物可以催化葡萄糖酵解为乳酸的发现,成了德国生物化学家们在廿世纪三十年代更为充分研究的起点。这一时期贡献重大的有 Gustav Embden,他曾假定 1,6-二磷酸果糖裂解的方式及其后一些步骤的总模型;以及 Otto Meyerhof 证实了 Embden 的假说的主要部分,并研究了糖酵解的能量学。由葡萄糖至丙酮酸的反应序列常称为 Embden-Meyerhof 氏途径。Otto Warburg 在柏林, C. F. Cori 和 G. T. Cori 在美国,以及 J. Parnas 在波兰也作出了非常重要的贡献。

关于糖酵解的各个步骤,虽自 1940 年左右便弄清楚了,但是对此途径的研究决不是就此停止了。事实上,目前对糖酵解酶类的深入研究正揭示出在糖酵解序列中的某些酶参与完整细胞内糖酵解的调节机制。虽然对于发酵和糖酵解机制的经典研究多数是在酵母提出物和肌肉提出物进行的,但是在大多数生物这些途径只有很少的变化,表示这一古老的能量产生途径在进化生存上的价值。

不同的种族或细胞类型之间,糖酵解序列的同系酶的性质有时有所差别。这种差别作为种族或组织分化的反映,可能与此途径在调节上的差别有关。

## 糖酵解的阶段

糖酵解由 11 个酶的连续作用所催化,这些酶大多数已经结晶出来,而且经过详尽的研究。它们很容易以溶解的形式从细胞抽取出来,因此一般相信它们集中在细胞质的可溶部分内,另外还认为这些催化糖酵解步骤的每一个酶之间,并没有物理学上的相互依存,即它们看来并没有联合成一个稳定的多酶复合体;不过有些事实证明,糖酵解的某些个别的酶在不同类型的细胞中可以和质膜、肌纤维或线粒体松弛地联系着。

葡萄糖与丙酮酸之间所有的糖酵解中间产物都是磷酸化的化合物。其磷酸根有三种作用:它们给每一个中间产物提供一个极性负电荷基团,使之不能透过细胞膜,因为细胞膜一般不允许高极性分子通过。事实上,当 pH 为 7 时,大多数中间代谢产物都是离子化合物,这就阻止它们通过简单的扩散漏出细胞。其次,糖酵解中间产物的磷酸根在酶-底



物复合物的形成中还用作联结或识别基团。但糖酵解中间产物磷酸根的最重要的作用是储存能量。因为在糖酵解过程中这些磷酸根终将变成 ATP 的末端磷酸根。

无氧糖酵解(图 16-3)有两个主要的阶段。在第一阶段中,葡萄糖通过磷酸化作用为其分解代谢作好准备,然后裂解为 3-碳糖,即 3-磷酸甘油醛;在第二阶段中,3-磷酸甘油醛转变成乳酸。糖酵解的第一阶段是一个准备的或收集的时期。在这一时期中,若干不

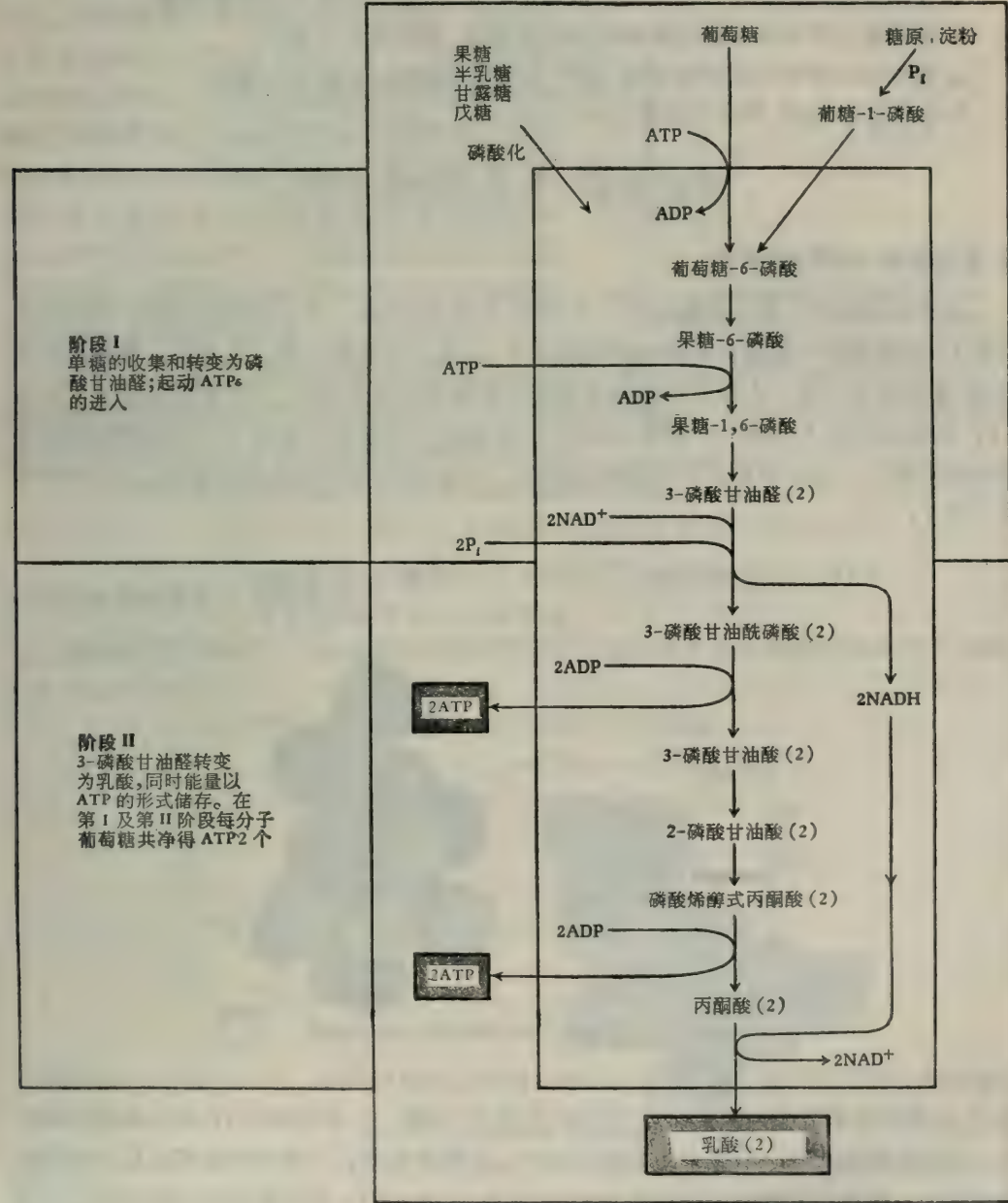


图 16-3 糖酵解的两个阶段。进入酵解系统的物质为果糖、半乳糖、甘露糖、戊糖、糖原淀粉、葡萄糖-1-磷酸、ATP、2 P<sub>i</sub> 等。产物用方块表示。从葡萄糖-6-磷酸开始的途径,在糖酵解和酒精发酵是一样的。虽然糖酵解一词最初用以表示葡萄糖分解为乳酸,本章亦如此应用,但是这一名词亦常不严格地用于达到丙酮酸阶段的途径。

同的己糖被 ATP 磷酸化后进入糖酵解序列,并转变成共同产物——3-磷酸甘油醛。这时两分子 ATP 被消耗,使己糖在 1 位和 6 位上磷酸化,这与泵的起动相类似。糖酵解的第二阶段是所有糖类的共同途径。在这一阶段中出现氧化还原步骤以及能量储存机制,通过这一机制 ADP 磷酸化为 ATP。在第二阶段有四分子 ATP 形成,因此扣除起动用的 ATP 后每一分子葡萄糖降解为乳酸时净得两分子 ATP。

在糖酵解过程中发生三种不同类型的化学变化,它们的途径互相联系着:

1. 通过反应序列葡萄糖的碳架降解形成乳酸,即碳原子的途径;
2. 通过反应序列无机磷酸变成 ATP 的末端磷酸根,即磷酸的途径;
3. 氧化还原序列,即电子的途径。

## 糖酵解第一阶段的酶促步骤

### D-葡萄糖由 ATP 磷酸化

这是糖酵解两个起动步骤中第一个利用 ATP 的步骤。在此步骤中 ATP 被消耗使中性 D-葡萄糖分子磷酸化为带负电荷的分子,为其后的酶促步骤作好准备。细胞内游离的 D-葡萄糖相当少,大部分细胞内葡萄糖以磷酸化的形式存在。D-葡萄糖在 6 位上被 ATP 磷酸化生成 6-磷酸-D-葡萄糖(图 16-4)的这一过程受两种酶——己糖激酶和葡萄糖激酶所催化。它们对糖具有不同的特异性,对 D-葡萄糖的亲合力也不同,这两种酶的反应如下:

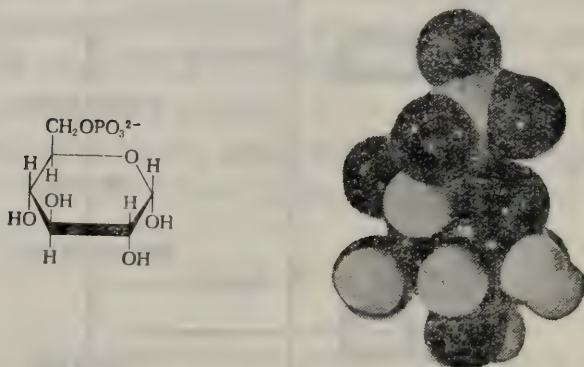
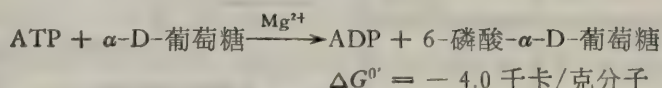


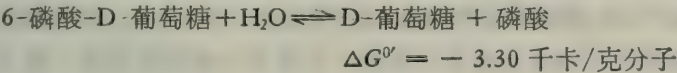
图 16-4 6-磷酸- $\alpha$ -D-葡萄糖的结构和实体模型

己糖激酶分布比较广泛,是一种为大多数细胞所正常使用的酶。它不仅催化 D-葡萄糖磷酸化,还催化许多其他己糖及己糖衍生物,包括 D-果糖、D-甘露糖和 D-氨基葡萄糖的磷酸化。它对己醛糖比对己酮糖有较高的亲合力。己糖激酶存在于酵母和细菌以及许多动植物组织中。酵母己糖激酶已被结晶出来(分子量为 96,000)。动物组织的己糖激酶有三种同功酶的形式。它们对葡萄糖的亲合力各异。动物组织的己糖激酶是一种调节酶,被它本身的产物——6-磷酸葡萄糖所抑制。每当细胞内 6-磷酸葡萄糖浓度很高,且不再需要其供应能量时,己糖激酶便被抑制,从而防止 6-磷酸葡萄糖进一步形成。



葡萄糖激酶是第二种葡萄糖磷酸化酶。它仅使 D-葡萄糖磷酸化而不作用于其他己糖。它对 D-葡萄糖的  $K_M$  甚高 ( $K_M = 10 \text{ mM}$ )。因此较己糖激酶 ( $K_M = 100 \mu\text{M}$ ) 需要更高的葡萄糖浓度使之充分活化。它与己糖激酶另一个区别是它不为 6-磷酸葡萄糖所抑制。它存在于肝内,且远多于己糖激酶,但在肌肉中则不存在。高糖饮食后血液葡萄糖浓度暂时升高时,此酶便发挥其正常作用 (图 16-5)。然而糖尿病患者缺乏此酶,这种病人血糖浓度高是由于胰腺激素(胰岛素)的分泌缺乏所致。己糖激酶及葡萄糖激酶均需要二价阳离子 ( $\text{Mg}^{2+}$  或  $\text{Mn}^{2+}$ )。这些阳离子首先与 ATP 结合形成真正的底物  $\text{Mg ATP}^{2-}$  或  $\text{Mn ATP}^{2-}$ 。己糖激酶被某些巯基试剂所抑制。己糖激酶或葡萄糖激酶使葡萄糖磷酸化的过程,在细胞内的情况下是不可逆的。

6-磷酸-D-葡萄糖经酶促脱磷酸再生成游离葡萄糖的过程是通过一种完全不同的酶——6-磷酸葡萄糖酶的作用发生的。这一过程是肝内一种十分重要的反应,它使游离葡萄糖释放入血。



### 6-磷酸葡萄糖转变为 6-磷酸果糖

磷酸葡萄糖异构酶已从肌肉组织分离成高度纯品,它催化 6-磷酸葡萄糖异构化为 6-磷酸果糖 (图 16-6):

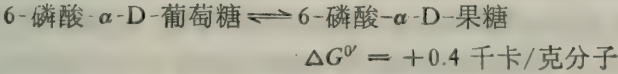


图 16-6 6-磷酸- $\alpha$ -D-果糖的结构

此反应易于向任一方向进行。而且在细胞内是可逆的。磷酸葡萄糖异构酶对 6-磷酸葡萄糖及 6-磷酸果糖具有特异性。

### 6-磷酸-D-果糖磷酸化为 1, 6-二磷酸果糖

这是糖酵解的两个起始反应中的第二个反应。这一反应通过 6-磷酸果糖激酶的作用

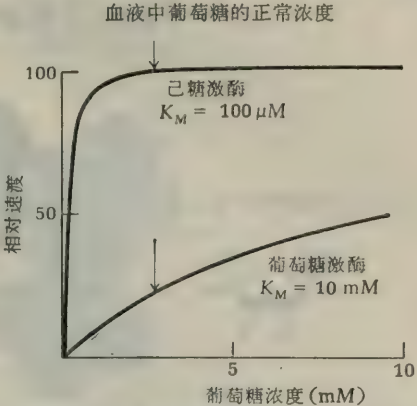


图 16-5 己糖激酶和葡萄糖激酶的比较。当血液葡萄糖浓度正常 (约 5 mM) 时,己糖激酶是充分饱和的。当血液葡萄糖浓度变得非常高时,肝内的葡萄糖激酶变得更为活跃。

用,投入第二个 ATP 分子。使 6-磷酸果糖在 1 位上磷酸化为 1, 6-二磷酸果糖 (图 16-7):

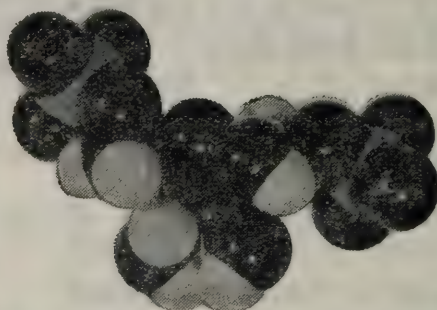
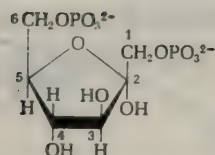
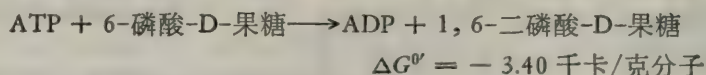
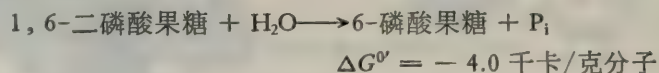


图 16-7 1, 6-二磷酸- $\alpha$ -D-果糖的结构和实体模型国际命名委员会推荐用字头 bis 代替 di; 因此这个化合物  $\alpha$ -D-fructose 1,6-diphosphate 应为  $\alpha$ -D-fructose 1,6-bisphosphate。

这一过程需要  $\text{Mg}^{2+}$ , 需要  $\text{Mg}^{2+}$  的原因可能是因为真正的底物是  $\text{Mg ATP}^{2-}$ 。虽然在反应中 6-磷酸果糖是特异性的磷酸受体,但是 UTP 及 ITP 可替代 ATP 作为磷酸供体。

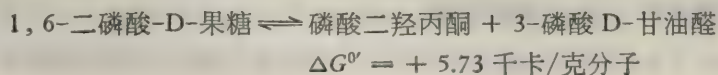
磷酸果糖激酶是一种变构酶; 6-磷酸果糖的磷酸化是糖酵解序列中一个极重要的控制点。和许多变构酶一样,磷酸果糖激酶的分子量较高 (380,000), 包含许多亚基,且其反应速度对其底物浓度表现出复杂的依从关系。它有多个变构调节物,能为高浓度的 ATP、柠檬酸及长链的脂肪酸所抑制,为 ADP 或 AMP 所激活。因此只要细胞内 ATP 浓度很高或只要有脂肪酸或柠檬酸等其他燃料时, 6-磷酸果糖激酶便被抑制而中断糖酵解。相反,只要 ATP 浓度很低, AMP 和 ADP 占优势时,或柠檬酸、脂肪酸等其他燃料浓度很低时, 6-磷酸果糖激酶的活性便受到激动。因此, 6-磷酸果糖激酶的动力作用虽然十分复杂,却极适宜于糖酵解的这一重要步骤的调节。此酶的正性和负性变构调节剂随细胞类型而不同。6-磷酸果糖激酶在调节糖酵解速度中的作用将在以后更详细地描述。6-磷酸果糖激酶反应在细胞内基本上是不可逆的,可回想一下,大多数调节酶类都是催化不可逆的反应的。

通过另一条不同的酶促途径, 1,6-二磷酸-D-果糖受己糖二磷酸酶的催化,经水解反应,可以转变回 6-磷酸果糖。己糖二磷酸酶也是一种变构酶。它在葡萄糖生物合成中的调节作用将在以后讨论:



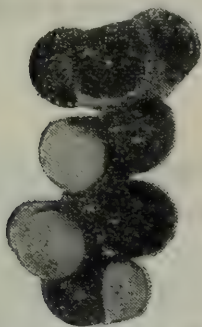
### 1, 6-二磷酸果糖分裂为磷酸二羟丙酮和 3-磷酸甘油醛

这一反应由经过充分研究的二磷酸果糖醛缩酶所催化。这种酶很容易从兔肌提出物以结晶的形式分离出来。所催化的反应是可逆的醛醇缩合反应,产生两个不同的磷酸丙糖:





产物的结构见图 16-8。



磷酸二羟丙酮



3-磷酸 D-甘油醛

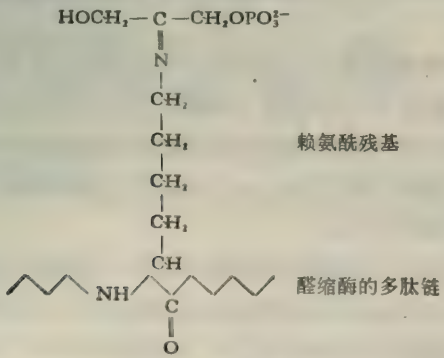
图 16-8 磷酸丙糖。结构左方的数目字代表磷酸丙糖的碳原子。右方括弧内的数字代表 1, 6-二磷酸果糖分子的碳原子直接衍生为丙糖的碳原子。

这一反应的  $\Delta G^0$  虽然是强正值，但是在细胞内它易于向前进行。（见本章问题 9 和 10）

高等动植物中的典型二磷酸果糖醛缩酶通常称为醛缩酶 1 类。它是由骨骼肌分离出来的一种酶。分子量为 160,000，具有 4 个亚基。它亦含有若干个游离的  $-\text{SH}$  基，其中有些为催化活性所必需，在有还原剂氢硼化钠的情况下，将结晶的肌肉醛缩酶和磷酸二羟丙酮一起培养，可在酶分子和磷酸二羟丙酮之间形成一个稳定的共价键。水解无催化活性的被束缚的酶-底物复合物时，产生一个酶的赖氨酸残基的  $\sigma$ -氨基的甘油基衍生物。这些事实导致这一结论：肌肉醛缩酶在酶的赖氨酸残基的  $\sigma$ -氨基与磷酸二羟丙酮的羰基（图 16-9）之间形成了一个共价的酶-底物化合物（一个 Schiff 氏碱或酮亚胺）。Schiff 氏碱失去了一个质子，形成负碳离子，后者在摄取一个质子后作用于 3-磷酸甘油醛的醛式碳原子，产生 1, 6-二磷酸果糖和游离的酶。上述过程是可逆的。

二磷酸果糖醛缩酶 1 类有几种不同的同功酶形式。在家兔组织中，此酶有三种主要

磷酸二羟丙酮和酶蛋白的一个特定赖氨酸残基之间的 Schiff 氏碱的结构



二羟丙酮的赖氨酸衍生物，由还原的醛缩酶-底物复合物水解产物分离而来。

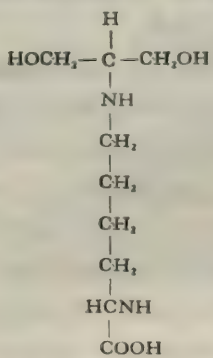


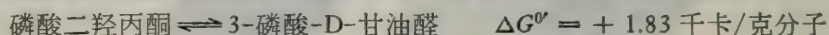
图 16-9 醛缩酶的酶-底物化合物

形式：醛缩酶 A (主要在肌肉中)，醛缩酶 B (在肝内) 和醛缩酶 C (在脑内)。它们都有 4 个氨基酸成分不同的多肽亚基。

在细菌、酵母和霉菌中发现的二磷酸果糖醛缩酶 (醛缩酶 II 类) 与 I 类不同。它们含有一个特定的二价金属离子，通常是  $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$  或  $\text{Fe}^{2+}$ ；它们也需要  $\text{K}^+$ 。其分子量约 65,000，比动物酶类的分子量的一半还小。它们的作用机制与 I 类醛缩酶不同，它们不形成 Schiff 氏碱中间产物。

### 磷酸丙糖的互相转变

两种磷酸丙糖中只有一个即 3-磷酸甘油醛能在糖酵解的进一步反应中直接降解。而另一个磷酸二羟丙酮则通过磷酸丙糖异构酶可逆地转变为 3-磷酸甘油醛：



注意：通过这一反应，最初的葡萄糖的 1 和 6 碳原子现在已变为 3-磷酸-D-甘油醛的 3 碳原子了。同样的，葡萄糖的碳原子 2 和 5 变成 3-磷酸-D-甘油醛的碳 2，葡萄糖的碳 3,4 变成 3-磷酸-D-甘油醛的碳 1。在两种磷酸丙糖的平衡混合物中，磷酸二羟丙酮占 90% 以上。

这一反应完成了糖酵解的第一阶段。在这一阶段中，葡萄糖分子经过两次起动的磷酸化步骤并裂解，为第二阶段做了准备。至于将糖原、淀粉以及葡萄糖以外的糖类送入第一阶段的“收集”反应，将在以后叙述。

## 糖酵解的第二阶段

此阶段 (图 16-3) 包括氧化还原步骤及由 ADP 产生 ATP 的磷酸化步骤。由于一个葡萄糖分子分成两个 3-磷酸甘油醛，因此葡萄糖的两半进入同样的途径。

### 3-磷酸甘油醛氧化为 3-磷酸甘油酰磷酸

这是糖酵解序列中最重要的步骤之一，因为它以 3-磷酸甘油醛的氧化产物 3-磷酸甘油酰磷酸的形式，将前者的醛基氧化所产生的能量储存起来，Warburg 及其同事在 1938—1939 年阐明了这一途径及其后续反应，这被认为是现代生物学中最重要的成就之一，因为它第一次阐明了一个有机分子通过酶促机制和化学的机制氧化产生的能量，能够以 ATP 的方式储存起来。

这里我们要插入几句以澄清糖酵解中各种磷酸化三碳中间产物在命名上的前后矛盾。虽然到此为止，我们仍沿用着公认的名称——甘油醛-3-磷酸，但在以后的讨论中用另一同样正确的名称——3-磷酸甘油醛是有好处的。因为后者强调在磷酸和 3-磷酸甘油醛碳原子 3 之间的酯键在以下的两个糖酵解中间产物——3-磷酸甘油酰磷酸 (其另一个磷酸在碳原子 1 上) 和 3-磷酸甘油酸中保持不变。

催化 3-磷酸甘油醛氧化的酶，通常叫做甘油醛磷酸脱氢酶 (或称 3-磷酸甘油醛脱氢酶)，很容易以结晶的形式 (分子量 = 140,000) 从兔肌或酵母中分离出来。它含有四个相同的亚基，每一个亚基由一条约有 330 个残基的多肽链所组成，其氨基酸序列已被推断出来。由酶催化的总反应如下：







$$\Delta G_s^{\circ'} = \Delta G_1^{\circ'} + \Delta G_2^{\circ'}$$

$$= -10.3 + 11.8 = +1.5 \text{ 千卡/克分子}$$

RCHO 被  $\text{NAD}^+$  氧化是一个高度放能的过程,从 1 M 反应物浓度开始,它可以正常地按照上述方程式的方向进行很远;由 3-磷酸甘油酸和磷酸形成 3-磷酸甘油酰磷酸则是高度吸能的,因此它不能按书写的方向进行。但是在总的酶促反应中,吸能过程和放能过程必然地偶联着,因此醛氧化释放的能量以 3-磷酸甘油酰磷酸的高能酰基磷酸根的形式储存起来。

这一重要的氧化还原过程的机制已经过详细的研究(图 16-11)。酶的四个相同的亚基各含有一个活性催化部位,与一分子  $\text{NAD}^+$  结合,3-磷酸甘油醛脱氢酶受重金属及烷化剂(如碘醋酸)抑制,由于这个以及其他理由已经肯定活性部位中的巯基是催化活性所必需的。酶首先和氧化型辅酶  $\text{NAD}^+$  结合。在这一反应中,必需的巯基在空间上被掩蔽(图 16-11)。在第二步,底物的醛基和巯基形成硫半缩醛键,然后此酶催化氢由共价结合的 3-磷酸甘油醛转移到结合的  $\text{NAD}^+$  上,在酶的巯基和底物的羧基之间形成硫酯。这种形式的酶称为酰基酶,然后  $\text{NADH}$  离开酶的活性部位与介质中的一分子游离  $\text{NAD}^+$  交换,于是酰基从酶的巯基转移到无机磷酸上,形成氧化产物 3-磷酸甘油酰磷酸。而此酶的游离氧化型现在可以开始另一个催化周期。

此酶特异地需要  $\text{NAD}^+$  作为氧化剂。虽然它对 D-3-磷酸甘油醛活性最高,但亦能氧化 D-或 L-甘油醛,甚至氧化乙醛,不过速度非常慢。此酶还能利用砷酸代替磷酸,可能形成 3-磷酸甘油酰砷酸(见图 16-12)。它是高度不稳定的化合物,在水溶液系统中能立刻自发地分解为 3-磷酸甘油酸和砷酸。注意:在有砷酸存在时,即使整个氧化还原作用照样进行,亦不能通过脱氢酶的作用产生高能磷酸化合物。用这个方法,砷酸能使氧化和磷酸化过程解偶联。

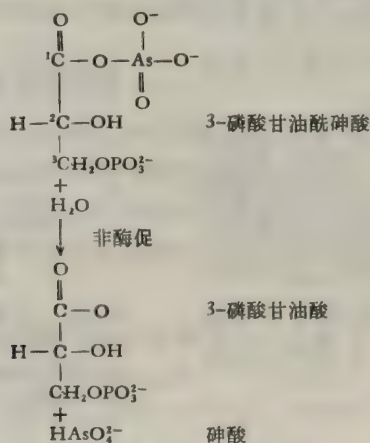


图 16-12 砷酸的解偶联作用

3-磷酸甘油醛脱氢酶是一种变构酶;  $\text{NAD}^+$  是它的主要效应器,同时又是它的底物之一。此酶有四个与  $\text{NAD}^+$  结合的部位。与第一个  $\text{NAD}^+$  分子结合后,其它亚基与  $\text{NAD}^+$  结合的亲和力便下降,但其内在活性则增强。这是表现负协作的变构酶的一个例子。



磷酸由 3-磷酸甘油酰磷酸转移到 ADP

Warburg 及其同事证明前一反应中形成的 3-磷酸甘油酰磷酸现在与 ADP 进行酶促反应,将其酰基磷酸根转移到 ADP, 生成3-磷酸甘油酸 (图 16-13)。这一反应由磷酸甘油酸激酶催化:

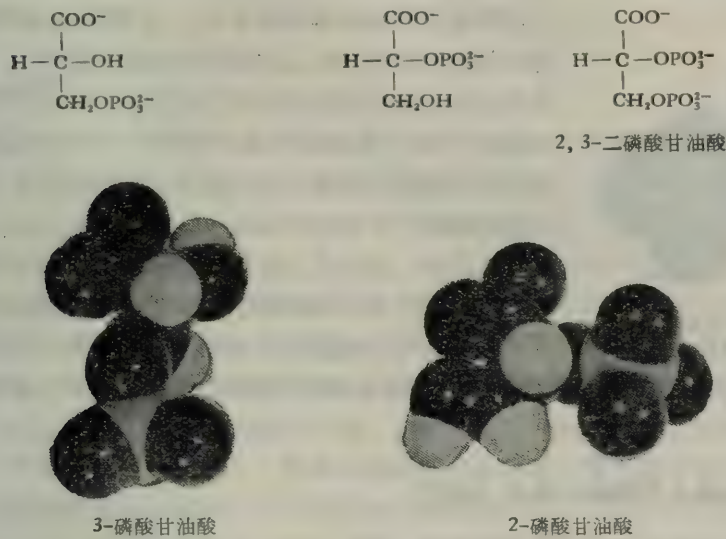
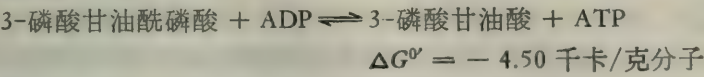
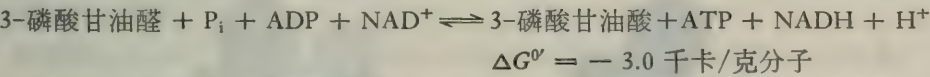


图 16-13 磷酸化的 D-甘油酸的结构及实体模型

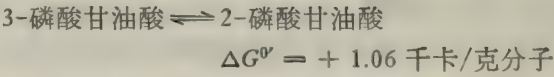
这一反应是高度放能的,可“促使”上述反应完成,磷酸转移酶对 3-磷酸甘油酰磷酸有极高度的亲和力.总反应方程式包括两个反应:第一,通过 3-磷酸甘油醛脱氢酶的作用使 3-磷酸甘油醛氧化为 3-磷酸甘油酰磷酸;第二,通过磷酸甘油酸激酶的催化作用,使酰基磷酸根转移到 ADP.此总方程式如下:



通过这两个连续的反应,醛基氧化为羧基所产生的能量,即以 ATP 的形式储存起来。

3-磷酸甘油酸转变为2-磷酸甘油酸

这一反应由磷酸甘油变位酶催化:

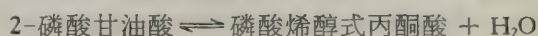


将磷酸从甘油酸的 3 位移至 2 位 (见图 16-13) 的这一反应需有 Mg<sup>2+</sup>。这一反应的标准自由能变化很少,在细胞内是完全可逆的.此酶有两种形式;在动物组织中的需要 2, 3-二磷酸甘油酸作为中间产物,按下列方程式进行:



## 2-磷酸甘油酸脱水形成磷酸烯醇式丙酮酸

2-磷酸甘油酸转变为磷酸烯醇式丙酮酸是糖酵解序列中第二个产生高能磷酸化合物的反应(图 16—14)。它由烯醇酶催化:



$$\Delta G^{\circ} = + 0.44 \text{ 千卡/克分子}$$

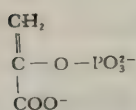


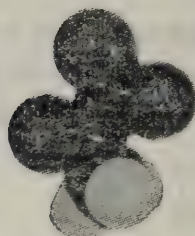
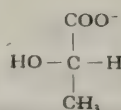
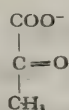
图 16-14 磷酸烯醇式丙酮酸的结构和实体模型

烯醇酶已经从数种来源获得纯结晶型。分子量为 85,000。它绝对需要二价阳离子 ( $\text{Mg}^{2+}$  或  $\text{Mn}^{2+}$ )。在和底物结合前这些二价阳离子先和酶构成络合物。此酶可被氟化物强烈抑制,特别是有磷酸存在时,其抑制物是氟磷酸离子,它与  $\text{Mg}^{2+}$  形成络合物。虽然由烯醇酶催化的反应在形式上是从 2-磷酸甘油酸的 2-和 3-位碳原子上脱去一分子的水,但此反应亦可视为分子内的氧化还原反应,因为脱水使碳原子 2 变得更氧化一些而碳原子 3 变得更还原一些。尽管这一反应的标准自由能变化较少,但是反应物和产物的磷酸根的水解标准自由能变化却非常之大,2-磷酸甘油酸的标准自由能变化约为 -4.2 千卡/克分子。磷酸烯醇式丙酮酸的约为 -14.8 千卡/克分子。

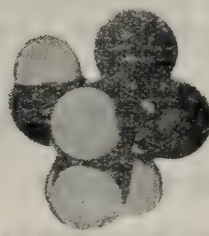
显然当 2-磷酸甘油酸脱水转变为磷酸烯醇式丙酮酸时,分子内部的能量分配起了很大的变化。

## 磷酸由磷酸烯醇式丙酮酸转移到 ADP

磷酸根由磷酸烯醇式丙酮酸转移到 ADP 并产生游离的丙酮酸(图 16-15)是由丙酮酸激酶催化的。



丙酮酸



L-乳酸

图 16-15 丙酮酸和乳酸的结构和实体模型



$$\Delta G^{\circ} = - 7.5 \text{ 千卡/克分子}$$

此酶已经获得纯结晶型,分子量为 250,000。这一反应是高度放能的,已知在细胞内是不可逆的。此酶需要  $\text{Mg}^{2+}$  或  $\text{Mn}^{2+}$ 。在其与底物结合前必须与  $\text{Mn}^{2+}$  或  $\text{Mg}^{2+}$  形成络合物。



$\text{Ca}^{2+}$  可与  $\text{Mn}^{2+}$  或  $\text{Mg}^{2+}$  竞争形成无活性络合物。此酶还需要一个碱金属阳离子（可能是  $\text{K}^+$ ,  $\text{Rb}^+$  或  $\text{Cs}^+$ ）， $\text{K}^+$  是生理性激活剂。人们认为与  $\text{K}^+$  结合可使酶产生构型上的变化，生成活性更大的形式。在哺乳类，丙酮酸激酶是一种调节酶，在不同的组织中有不同的型式。L（或肝）型可由 1, 6-二磷酸果糖及高浓度的磷酸烯醇式丙酮酸激活，而被 ATP、AMP、柠檬酸和丙氨酸抑制，还能由长链脂肪酸和乙酰 CoA 抑制。M（或肌肉）型不能被 1, 6-二磷酸果糖激活，但被苯丙氨酸抑制。和己糖激酶、6-磷酸果糖激酶一样，当细胞内 ATP 浓度较高或有脂肪酸、柠檬酸、乙酰 CoA 或丙氨酸等其它燃料时，丙酮酸激酶的作用即被关闭，而当上述糖酵解的中间产物，尤其是 1, 6-二磷酸果糖和磷酸烯醇式丙酮酸增加时即“开动”。

丙酮酸还原为乳酸

在糖酵解的最后一个步骤中，丙酮酸靠原来由 3-磷酸甘油醛供给的电子还原为乳酸。这些电子是由 NADH 携带的。反应由乳酸脱氢酶催化：

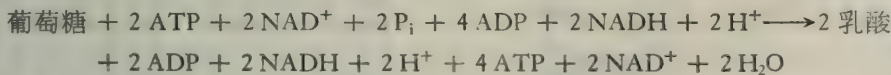


$\Delta G^{\circ}$  负值很大，提示此反应的总平衡大大向右。乳酸脱氢酶在高等动物中至少有 5 种不同的分子形式或同工酶。当丙酮酸的浓度很低时，它们使丙酮酸还原的速度是不同的。它们在糖酵解中的调节作用将在别处详述。这一反应完成了糖酵解的内在氧化还原循环。

乳酸是无氧情况下糖酵解序列的终产物，它作为废物经细胞膜扩散到细胞周围。当进行短短的一阵异常强烈的活动时，高等动物的肌肉必须在无氧状态下进行活动。从肌肉细胞进入血液的乳酸由肝脏利用并改造为血液葡萄糖。

总 平 衡 表

现在我们可以造一个糖酵解的平衡表以说明葡萄糖碳骨架的去向、氧化还原反应，以及所投入和产生的磷酸 ADP 及 ATP。下列方程式的左侧部分表示进入糖酵解序列的全部物质。右侧表示所有的产物，按每一个分子葡萄糖产生 2 个分子的 3-磷酸甘油醛这一事实来调整：



方程式两侧同项相消得下式



在这个总过程中，D-葡萄糖转化为两分子乳酸，而两分子 ADP 和磷酸转变为 ATP，四个电子则通过  $2 \text{NADH} + 2 \text{H}^+$  从 3-磷酸甘油醛转到丙酮酸。起动上述过程需要供给 2 分子 ATP 而产生 4 分子 ATP。结果每一分子葡萄糖转变可净产生 2 个 ATP。

完整细胞中糖酵解的能学

完整细胞内糖酵解的能学引起了很大的兴趣。这一分析已在人的红细胞上完成。红

细胞和体内大多数细胞不同，它的能量全部由糖酵解获取。已测出红细胞内糖酵解的所有中间产物在稳态下的实际浓度(表 16-1)，根据这些数值以及已知的糖酵解反应的平衡常数,即可按一般方程式算出完整红细胞内每一步骤的自由能变化 ( $\Delta G$ ，不是  $\Delta G^0$ )。

$$\Delta G = \Delta G^0 + RT \ln \frac{[C]^c [D]^d}{[A]^a [B]^b}$$

此方程式是适当考虑了反应的化学计算经过校正的。根据这些结果，作出稳态下完整红细胞内糖酵解自由能的剖面图(图 16-16)。图中表示糖酵解中的 8 个反应是处于或非常接近于平衡的(因其  $\Delta G$  值接近于 0)，而另三个反应,即己糖激酶、磷酸果糖激酶和丙酮酸激酶反应的  $\Delta G$  有大幅度的下降,因此远离平衡。根据这些数据还可计算出 ATP 水解的自由能在细胞内大约为  $-13.3$  千卡/克分子。红细胞糖酵解中能量回收的实际效率约为 53%，比根据标准自由能数据计算的理论上的效率(31%)要高得多。

表 16-1 人的红细胞内糖酵解中间产物的稳态浓度

中间产物	浓度 ( $\mu M$ )
葡萄糖	5,000
6-磷酸葡萄糖 (G6P)	83
6-磷酸果糖 (F6P)	14
1, 6-二磷酸果糖 (FDP)	31
磷酸二羟丙酮 (DHP)	138
3-磷酸甘油醛 (GAP)	18.5
3-磷酸甘油酸 (3PG)	118
2-磷酸甘油酸 (2PG)	29.5
磷酸烯醇式丙酮酸 (PEP)	23
丙酮酸 (Pyr)	51
乳酸 (Lact)	2,900
ATP	1,850
ADP	138
磷酸	1,000

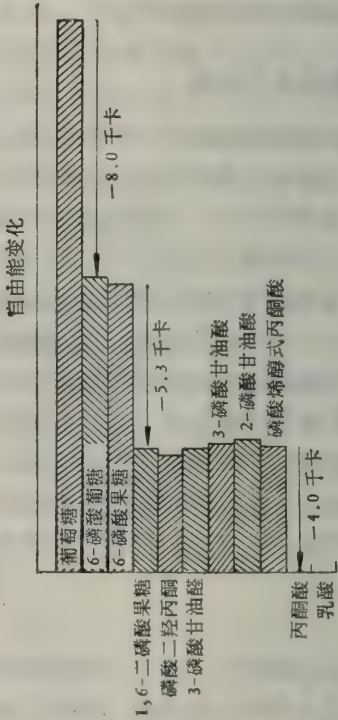


图 16-16 人的红细胞内糖酵解的自由能剖面图。除由己糖激酶，磷酸果糖激酶和丙酮酸激酶催化的反应(其  $\Delta G$  有很大的下降)外,其余的反应均处于或接近于平衡。细胞内糖酵解的各个步骤必须在自由能无变化或下降时才能向前进行。此处有几个糖酵解的步骤自由能轻度上升,必须理解为实验测定误差所致。

目前已有充分证据证明磷酸果糖激酶反应是糖酵解中的主要限速反应。但至少还有两个次要的调节点可以在特殊情况下起限速作用，此即己糖激酶和丙酮酸激酶催化的反应。这两者都是变构酶。3-磷酸甘油醛脱氢酶\*亦表现有调节酶的特性,但在活体内它在调节糖酵解中的作用尚不清楚。关于葡萄糖利用速度的调节将在第十九、二十九和三十章中进一步讨论。

\* 原书误为 3-磷酸甘油醛。——译者注

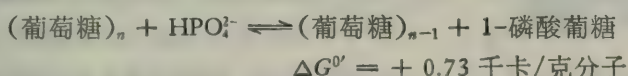


## 其它糖类进入糖酵解序列的通路

储存的多糖(糖原和淀粉)以及除 D-葡萄糖以外的单糖通过一些辅助酶所催化的支线进入糖酵解的第一个阶段。现在将叙述这些辅助酶类的作用。

### 糖原和淀粉

糖原和淀粉的 D-葡萄糖单位通过两种酶——糖原磷酸化酶(或在植物通过淀粉磷酸化酶)和磷酸葡萄糖变位酶的顺序作用进入糖酵解序列。糖原磷酸化酶和淀粉磷酸化酶是以  $\alpha(1 \rightarrow 4)$ -葡聚糖磷酸化酶命名的整个酶类中的两个。它们广泛地分布在动植物以及微生物细胞中,催化下述的一般性反应。其中(葡萄糖)<sub>n</sub> 代表葡聚糖链,而(葡萄糖)<sub>n-1</sub> 代表缩短了了的葡聚糖链:



在这一反应中,糖原侧链非还原性末端的  $\alpha(1 \rightarrow 4)$ -糖苷键发生磷酸解作用。正如加入水分子引起水解使一个分子裂解一样,加入磷酸组分亦能引起磷酸解使一个分子裂解。终末糖苷键的裂解使末端葡萄糖以 1-磷酸葡萄糖的方式脱去。余下的糖原链少了一个葡萄糖单位(图 16-17)。酶反复作用在糖原链的非还原性末端直至遇到它不能再起作用的  $\alpha(1 \rightarrow 6)$  分支点。这样,糖原磷酸化酶的彻底作用可产生一种极限糊精,经过脱支酶的作用后,糖原磷酸化酶又可再使之进一步降解。脱支酶是一种水解性的淀粉 1,6-糖苷酶,可水解分支点上的 1  $\rightarrow$  6 键,而使多糖链的另一段又可以受到糖原磷酸化酶的作用。

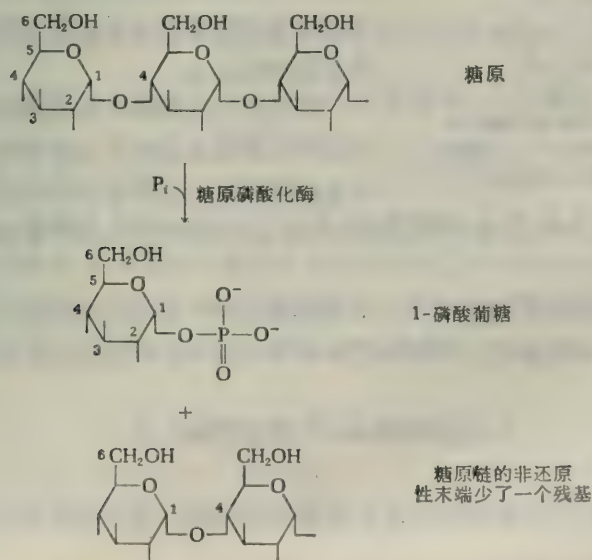


图 16-17 通过磷酸化酶的作用,从糖原链的非还原性末端经磷酸解脱去一个葡萄糖残基。

由 Cori 夫妇及其同事发现并详细地研究过的糖原磷酸化酶最初以为与细胞内糖原

的形成和分解都有关。但现在已发现它的主要作用是催化糖原的分解。在细胞内无机磷酸的浓度较高而 1-磷酸葡萄糖浓度较低。在这种条件下,磷酸化酶平衡大大有利于 1-磷酸葡萄糖的生成。另一种不同的酶,糖原合成酶,使磷酸葡萄糖单位形成糖原。

磷酸化酶在燃料储备(糖原和淀粉)与利用燃料的糖酵解序列之间处在一个十分重要的地位。它在肌肉和肝脏中的活性受一套精确的控制机构调节。骨骼肌的糖原磷酸化酶有两种形式:活性的形式(磷酸化酶 a)和活性小很多的形式(磷酸化酶 b)(见第九章)。两者均已被结晶出来。磷酸化酶 a 的分子量是 380,000,含有 4 个相同的亚基。每一亚基

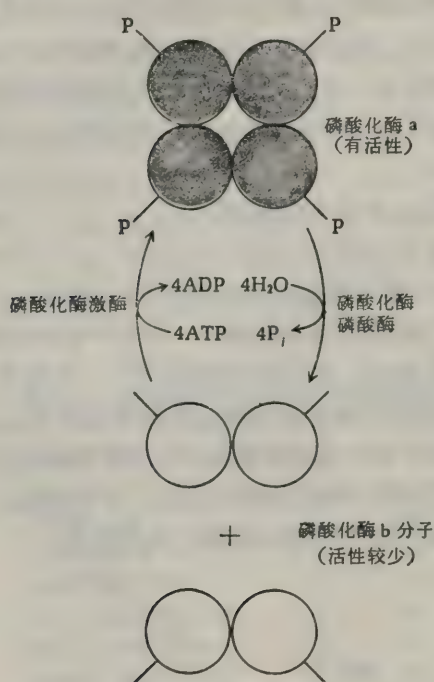


图 16-18 磷酸化酶 a 受磷酸化酶磷酸酶的作用转变为磷酸化酶 b, 以及磷酸化酶 b 受磷酸化酶激酶的作用复活。

含一个磷酸丝氨酸残基(为催化活性所必需)和一分子的磷酸吡哆醛,后者以共价键的方式与赖氨酸残基相结合,磷酸吡哆醛的作用尚不清楚。活性磷酸化酶 a 可受到水解酶——磷酸化酶磷酸酶的作用从磷酸丝氨酸残基脱去磷酸根(图 16-18)。这一反应使磷酸化酶 a 分解成两分子活性较小的磷酸化酶 b。磷酸化酶 b 回头转变为活性强的磷酸化酶 a 不是简单地通过上述反应的逆过程(上述反应是不可逆的),而是通过另一途径,即由 4 个分子的 ATP 在磷酸化酶激酶参加的情况下作用于两分子的磷酸化酶 b。这样通过磷酸化酶磷酸酶和磷酸化酶激酶的作用可以控制活性强的磷酸化酶 a 和活性较小的磷酸化酶 b 在细胞内的比例,并由此改变着糖原转变为 1-磷酸葡萄糖的速度。实际上,磷酸化酶激酶的活性本身亦受到调节,因为它也有活性型和非活性型,两者的比例受某些激素所控制。

肝脏亦含有磷酸化酶的活性型和非活性型。它们的比例亦受活性型与非活性型之间的相互转变速度所控制。但是在肝内的这些酶和肌肉内的

有着明显的结构上的差异,并受不同方式的控制,这与肝内和肌肉内葡萄糖代谢动力学上的不同是相符合的。

糖原和淀粉磷酸化酶反应的终产物 1-磷酸葡萄糖受一种很有趣的酶——磷酸葡萄糖变位酶的作用转变为 6-磷酸葡萄糖。这种酶已从多种来源获得纯品。它催化下述的容易可逆的反应



$$\Delta G^{\circ} = -1.74 \text{ 千卡/克分子}$$

它虽亦能催化 1-磷酸 D-甘露糖转变为 6-磷酸 D-甘露糖,但此反应速度仅及 1-磷酸 D-葡萄糖转变速度的百分之一。

磷酸葡萄糖变位酶含有一个为催化活性所必需的丝氨酸残基,其羟基在催化循环中与磷酸酯化,磷酸在葡萄糖 1 与 6 位之间转移(见下文)。丝氨酸残基的羟基亦可被抑制剂二异丙基氟磷酸酯化生成酶的非活性型。磷酸葡萄糖变位酶属丝氨酸类酶的一种。它不但



需要  $Mg^{2+}$  而且也需要一有机辅助因素, 即 1, 6-二磷酸葡萄糖, 大量事实提示后者在酶的作用中是一个中间产物, 有如下列连续步骤及图 16-19 所示。

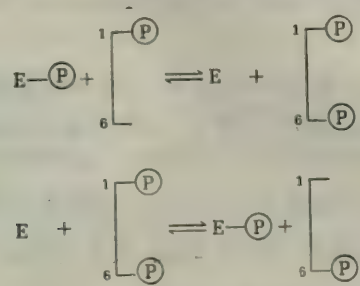


图 16-19 1, 6-二磷酸葡萄糖在磷酸葡萄糖变位酶反应中的作用图解

磷酸化的酶 + 1 磷酸葡萄糖  $\rightleftharpoons$  脱磷酸化的酶 + 1, 6-二磷酸葡萄糖  
 脱磷酸化的酶 + 1, 6-二磷酸葡萄糖  $\rightleftharpoons$  磷酸化的酶 + 6-磷酸葡萄糖  
 总和: 1-磷酸葡萄糖  $\rightleftharpoons$  6-磷酸葡萄糖

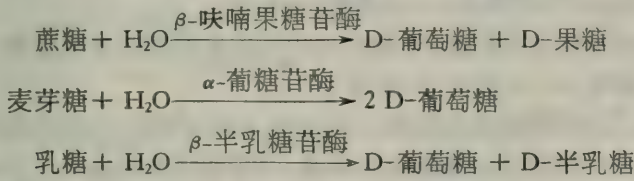
这样, 1, 6-二磷酸葡萄糖在磷酸葡萄糖变位酶反应中的作用与 2, 3-二磷酸甘油酸在磷酸甘油变位酶反应中的作用相似。

1, 6-二磷酸葡萄糖亦可由另一反应产生。  
 1-磷酸葡萄糖 + ATP  $\rightleftharpoons$  1, 6-二磷酸葡萄糖 + ADP

这一反应受磷酸葡萄糖激酶催化, 作为磷酸葡萄糖变位酶反应的产物而生成的 6-磷酸葡萄糖现在可以进入糖酵解循环。

## 双糖的进入

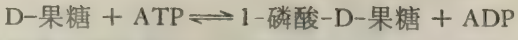
高等动物食入的双糖通常在小肠内吸收前水解为其单糖成分, 其最重要的反应如下:



分泌入小肠的乳糖酶和  $\beta$ -半乳糖苷酶在许多成年的阿拉伯人、犹太人、班图人、日本人、美国印第安人和非列宾人中其活性很低甚至缺如。这些人不能正常地吸收乳糖, 称为乳糖不耐。上述反应产生的单糖, 通过下述反应进入糖酵解。

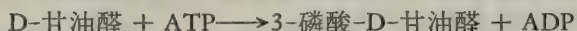
## 葡萄糖以外的单糖的进入

在脊椎动物的肝脏内果糖可通过果糖激酶的作用进入糖酵解。果糖激酶催化果糖在碳原子 1 磷酸化。



然后所产生的 1-磷酸果糖经醛缩酶的作用再解裂为 D-甘油醛和磷酸二羟丙酮  
 1-磷酸果糖  $\rightleftharpoons$  D-甘油醛 + 磷酸二羟丙酮

这样产生的游离 D-甘油醛在下述反应中磷酸化为 3-磷酸甘油醛



由此产生的磷酸二羟丙酮和 3-磷酸甘油醛当然是糖酵解的中间产物，并最终降解为丙酮酸。

己糖-D-半乳糖是乳类糖(D-乳糖)的一种成分，它受半乳糖激酶的作用在消耗 ATP 的情况下磷酸化，然后进入糖酵解循环： $\text{ATP} + \text{D-半乳糖} \longrightarrow \text{ADP} + \text{1-磷酸-D-半乳糖}$ 。

1-磷酸-D-半乳糖经过一系列需要三磷酸尿苷(UTP)为辅酶的反应在碳原子 4 上转变为其差向异构体，即 1-磷酸-D-葡萄糖(图 16-20)。关于它的以及其他需要 UTP 的糖的转化将在别处详述。

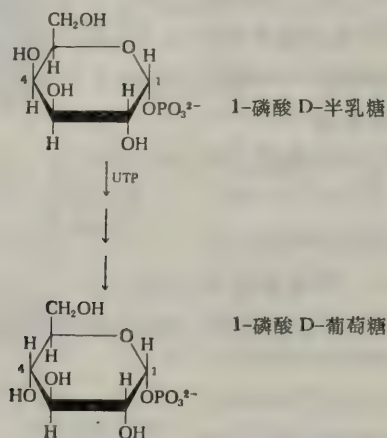
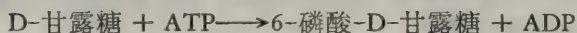
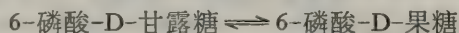


图 16-20 1-磷酸 D-半乳糖的差向异构化作用

D-甘露糖通过相对非特异性的己糖激酶于 6 位上磷酸化：



6-磷酸-D-甘露糖通过磷酸甘露糖异构酶的作用可逆地异构化为 6-磷酸-D-果糖：



戊糖也可以经其他机制磷酸化和转变成己糖与磷酸丙糖之后进入糖酵解循环。由三酰甘油和磷酸甘油酯分别衍生的甘油和 3-磷酸-L-甘油亦能被利用。游离甘油在消耗 ATP 的情况下由甘油激酶磷酸化：



然后 3-磷酸 L-甘油可通过细胞质的 3-磷酸甘油脱氢酶(一种需要  $\text{NAD}^+$  作为电子受体的酶)，或通过线粒体的 3-磷酸甘油脱氢酶(一种黄素蛋白)氧化为磷酸二羟丙酮：



在这些反应中形成的磷酸二羟丙酮通过酶促作用转变为 3-磷酸甘油醛，进入糖酵解的第二阶段。

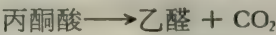
## 酒 精 发 酵

有些有机体，如酿酒的酵母，能把葡萄糖发酵为乙醇和  $\text{CO}_2$ ，而不是乳酸。这一发酵



途径除最后一个步骤外，其余的步骤和糖酵解中所描述的相同。它的最后一个步骤不是由乳酸脱氢酶催化，而是由另外两个酶促步骤（图 16-21）所代替。

在第一个步骤中，丙酮酸由不存在于动物组织的丙酮酸脱羧酶脱羧为乙醛和 CO<sub>2</sub>：



丙酮酸脱羧形成乙醛和 CO<sub>2</sub> 基本上是不可逆的。丙酮酸脱羧酶需要 Mg<sup>2+</sup>，并有一个结合牢固的辅酶——硫胺素焦磷酸。丙酮酸进行脱羧的过程经过一系列的与硫胺素焦磷酸共价结合的中间产物。（图 16-22）

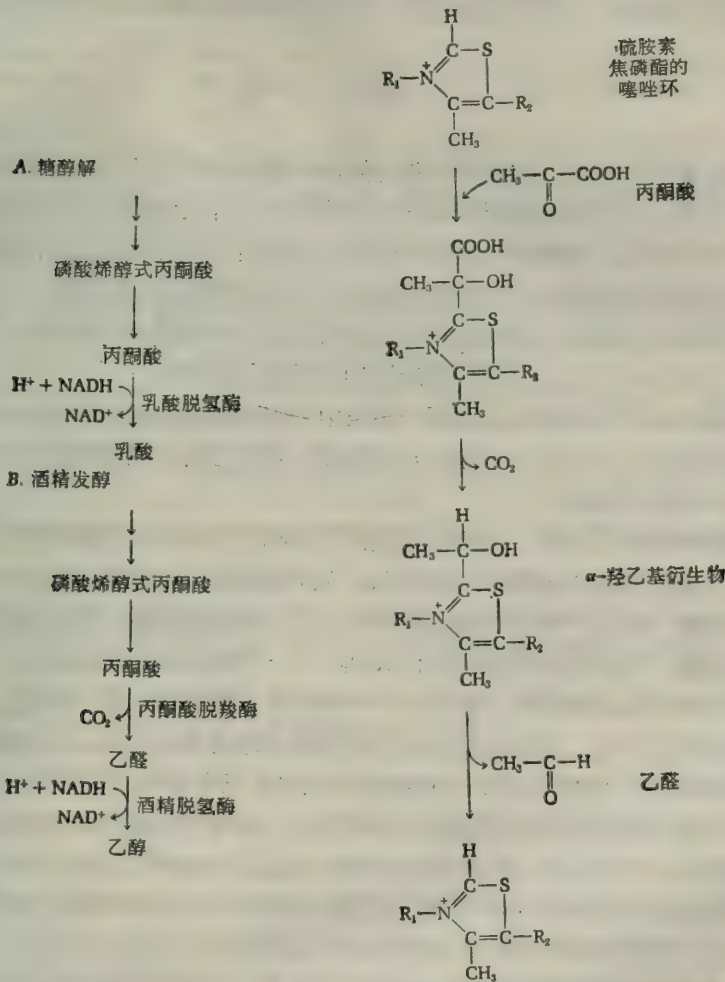
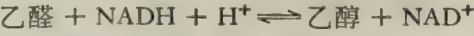


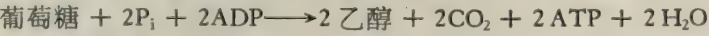
图 16-21 比较糖酵解(A)和酒精发酵(B)的最后步骤

图 16-22 与酶结合的硫胺素焦磷酸在丙酮酸脱羧过程中的作用步骤

在酒精发酵的最后步骤中，乙醛通过酒精脱氢酶由 NADH + H<sup>+</sup> 提供还原能力，还原为乙醇：



这样，乙醇和 CO<sub>2</sub> 成为酒精发酵的终产物。因此酒精发酵的总方程式可写为：



导致 ATP 形成的能量储存步骤在糖酵解和酒精发酵是一样的。

## 无氧发酵的其它类型

同型乳酸和酒精发酵都是最简单的普通发酵机制。但也已知还有另外一些途径,其中一部分是 Embden-Meyerhof 图解的变式。异型乳酸发酵或混合性乳酸发酵主要出现在微生物中,其终产物由一分子乳酸,一分子乙醇和一分子  $\text{CO}_2$  所组成。其他类型的细菌发酵以丙酸、丁酸、琥珀酸和丙酮为其终产物。微生物常用于化学工业,使糖类或其他天然的碳水化合物发酵,产生像丙酮、乙醇、丁醇及其他多种重要的化学物质。

### 摘 要

无氧发酵是从燃料(如葡萄糖)获得能量的最原始的途径。在厌氧细胞中它是产生能量的唯一过程。在多数兼性厌氧细胞它是葡萄糖分解代谢的第一个必经阶段,其后是发酵产物的有氧氧化。糖酵解和酒精发酵是发酵的两个最普通的类型。除最后一个步骤不同外,它们的能量储存机制是相同的。糖酵解的总方程式是,葡萄糖 +  $2\text{ADP} + 2\text{P}_i \longrightarrow 2$  乳酸 +  $2\text{ATP} + 2\text{H}_2\text{O}$ ; 酒精发酵的总方程式是,葡萄糖 +  $2\text{ADP} + 2\text{P}_i \longrightarrow 2$  乙醇 +  $2\text{CO}_2 + 2\text{ATP} + 2\text{H}_2\text{O}$ 。两种发酵基本上都是不可逆的。

糖酵解分两个阶段进行。在第一阶段中 D-葡萄糖通过酶促作用,由 ATP 磷酸化,最后分裂生成两个分子的 3-磷酸-D-甘油醛。其它己糖、戊糖和甘油在磷酸化后集中起来转变为 3-磷酸甘油醛。

在糖酵解的第二阶段,3-磷酸甘油醛通过磷酸甘油醛脱氢酶的作用,由  $\text{NAD}^+$  氧化并摄取无机磷酸形成 3-磷酸甘油酰磷酸。后者将其酰基磷酸根供给 ADP 生成 ATP 和 3-磷酸甘油酸,然后 3-磷酸甘油酸经异构化为 2-磷酸甘油酸,再经烯醇酶脱水生成磷酸烯醇式丙酮酸,后者将其磷酸根供给 ADP。另一产物游离丙酮酸则由 3-磷酸甘油醛脱氢形成的 NADH 还原成乳酸。有两分子 ATP 进入糖酵解的第一阶段。在第二阶段则由 ADP 生成四个 ATP。因此从每一分子葡萄糖可净得两个 ATP。在完整红细胞中糖酵解回收能量的效率在 50% 以上。在糖酵解过程中有三个基本上不可逆的步骤,分别由己糖激酶,6-磷酸果糖激酶以及丙酮酸激酶所催化。由调节酶磷酸果糖激酶催化的反应是糖酵解的主要限速步骤,通过糖原(淀粉)磷酸化酶以及磷酸葡萄糖变位酶的作用,糖原和淀粉的葡萄糖残基才能够进入糖酵解。使糖原转变为 1-磷酸葡萄糖的糖原磷酸化酶是一种调节酶,以活性高(磷酸化酶 a)和活性较低(磷酸化酶 b)的方式存在。葡萄糖以外的己糖果糖和半乳糖则通过酶促作用,像某些戊糖那样转变为糖酵解途径的中间产物。酒精发酵的反应序列,从开始至丙酮酸阶段和糖酵解是一样的,只是丙酮酸不是还原为乳酸而是脱羧为乙醛,后者再还原为乙醇。

### 参 考 文 献

#### 书籍

- Colowick, S. P., and N. O. Kaplan (eds.): *Carbohydrate Metabolism*, vol. 9 of *Methods in Enzymology*, Academic, New York, 1966. Compendium of experimental methods and approaches.  
Dickens, F., P. J. Randle, and W. J. Whelan: *Carbohydrate Metabolism and Its Disorders*, 2 vols.,



Academic, New York, 1968. A series of papers on metabolism and control mechanisms.

Florkin, M., and E. H. Stotz (eds.), *Carbohydrate Metabolism*, vol. 17 of *Comprehensive Biochemistry*, American Elsevier, New York, 1967.

Newsholme, E. A., and C. Start: "Regulation in Metabolism," Wiley, New York, 1974. An excellent and indispensable account of the regulatory steps of a number of metabolic processes.

## 论文

Axelrod, B.: "Glycolysis," pp. 112—145 in D. M. Greenberg (ed.), *Metabolic Pathways*, 3d ed., vol. 1, Academic, New York, 1967.

Colowick, S. P.: "The Hexokinases," pp. 1—48 in P. D. Boyer (ed.), *The Enzymes*, 3d ed., vol. 9, Academic, New York, 1973.

Everse, J., and N. O. Kaplan: "Lactate Dehydrogenases: Structure and Function," *Adv. Enzymol.*, 37: 61—134 (1973).

Fischer, E. H., A. Pocker, and J. C. Saari: "The Structure, Function, and Control of Glycogen Phosphorylase," *Essays Biochem.*, 6: 23—68 (1970). Excellent and comprehensive article on this complex enzyme.

Grisolia, S.: "Phosphoglyceromutases," in N. V. Thoai and J. Roche (eds.), *Homologous Enzymes and Biological Evolution*, Gordon and Breach, New York, 1971.

Lai, C. Y., and B. L. Horecker: "Aldolase: A Model for Enzyme Structure-Function Relationships," *Essays Biochem.*, 8: 149—178 (1972).

Mansour, T.: "Studies on Heart Phosphofructokinase: Purification, Inhibition, and Activation," *J. Biol. Chem.*, 238: 2285—2292 (1963).

Minikami, S., and H. Yoshikawa: "Thermodynamic Considerations of Erythrocyte Glycolysis," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 18: 345—349 (1965). Determination of the steady-state concentrations of intermediates and  $\Delta G$  of ATP hydrolysis in intact cell.

Passonneau, J. V., and O. H. Lowry: "Phosphofructokinase and the Pasteur Effect," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 7: 10—15 (1962). This and the following paper were important in demonstrating the important regulatory role of this enzyme.

Passonneau, J. V., and O. H. Lowry: "Phosphofructokinase and the Control of the Citric Acid Cycle," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 13: 372—379 (1963).

Purich, D. L., H. J. Fromm, and F. B. Rudolph: "The Hexokinases," *Adv. Enzymol.*, 39: 249—326 (1973).

Rolleston, F. S., and E. A. Newsholme: "Control of Glycolysis in Cerebral Cortex Slices," *Biochem. J.*, 104: 524—533 (1967). Provides valuable data on the concentrations of glycolytic intermediates under a variety of conditions and includes a very useful discussion of possible regulatory steps.

Stadtman, E. R.: "Allosteric Regulation of Enzyme Activity," *Adv. Enzymol.*, 28: 42—154 (1966). Pages 71 to 117 deal with enzymes of carbohydrate metabolism.

Villar-Palasi, C., and J. Larner: "Glycogen Metabolism and Glycolytic Enzymes," *Ann. Rev. Biochem.*, 39: 639—672 (1970). Comprehensive review and guide to recent research literature.

## 习题

1. 试推测足量加入下列各物质后, 酵母提出物使葡萄糖发酵变为乙醇的速度将增加 (+)、减少 (-) 或不变 (0): (a) 碘醋酸, (b) ATP, (c) ADP, (d) AMP, (e) 磷酸, (f) 氟化物, (g) 二硫化物 (与醛类反应), (h) 柠檬酸, (i) 砷酸。

2. 写出肝内 D-果糖转变为乳酸的平衡方程式 (a) 假定果糖由己糖激酶磷酸化, (b) 假定果糖由果糖激酶磷酸化。总方程式中应包括所有有关的磷酸化步骤。

3. 写出下列过程的平衡方程式, 包括所有有关的磷酸化步骤:

(a) 甘油转变为乳酸;

(b) 3-磷酸-L-甘油转变为乙醇和  $\text{CO}_2$

(c) D-甘露糖转变为磷酸烯醇式丙酮酸

(d) 蔗糖发酵成乙醇和  $\text{CO}_2$

(e) 甘油醛发酵为乙醇和  $\text{CO}_2$

4. 写出有  $\text{NAD}^+$ 、磷酸、ADP 和砷酸存在时 1, 6-二磷酸果糖转变为磷酸烯醇式丙酮酸的总方程式。
5. 将一种含有葡萄糖酒精发酵所需要全部酶类的酵母提出液与 200 mM D-葡萄糖、20 mM ATP、2.0 mM  $\text{NAD}^+$  和 20 mM 磷酸一齐培养、直至此系统达到平衡。
  - (a) 预测平衡时葡萄糖的浓度以及乙醇的浓度；
  - (b) 发酵怎样才能进行到底而使所有的葡萄糖转变成乙醇。
6. 写出纯肌肉醛缩酶作用于 1, 6-二磷酸果糖, D-甘油醛和乙醛混合物并达到平衡时存在的化合物的名称。
7. (a) 计算在与完整细胞内浓度相似的条件下(葡萄糖 = 5 mM, 磷酸 = 1.0 mM, ADP = 0.5 mM, ATP = 3.0 mM, 乳酸 = 3.0 mM)糖酵解时自由能的总的变化。  
 (b) 当乳酸浓度升到 100 mM 时自由能将如何变化。
8. 大脑皮层细胞内液的 3-磷酸甘油的浓度是 0.283 mM。而 2-磷酸甘油酸为 0.026 mM。求在此条件下 25°C 时磷酸甘油变位酶反应的自由能变化 ( $\Delta G$ )。
9. 当 1, 6-二磷酸果糖的初浓度为 (a) 1.0 M, (b) 0.1 M, (c) 0.01 M, (d) 0.001 M 和 (e)  $10^{-4}$  M 时, 计算出平衡时由纯醛缩酶分裂的 1, 6-二磷酸果糖的初浓度百分比。假定醛缩酶反应的  $\Delta G^{\circ}$  是 +5.73 千卡/克分子。
10. 大脑皮层组织细胞内液中的 1, 6-二磷酸果糖的浓度为 0.146 mM。两种磷酸丙糖的总浓度为 0.0942 mM。计算出在此条件下 25°C 时醛缩酶反应的自由能变化, 假定反应由磷酸丙糖异构酶催化达到平衡。
11. 取自大鼠肝脏的葡萄糖激酶的  $K_M$  为 10 mM, 最高催化活性约 1.5  $\mu\text{M}$ /分/每克鲜组织。而取自大鼠肝脏的己糖激酶的  $K_M$  约 0.1 mM, 最高催化活性为 0.1  $\mu\text{M}$ /分/克。求在下列葡萄糖浓度下葡萄糖激酶和己糖激酶活性的比例:
  - (a) 0.1 mM, (b) 1.0 mM, (c) 5.0 mM (正常),
  - (d) 10 mM, (e) 30 mM (糖尿水平)。

[黄美霞译 唐恢玲校]



## 第十七章 三羧酸循环和磷酸葡萄糖酸通路

现在我们开始讨论呼吸，它是嗜氧细胞利用分子氧以氧化燃料分子从而获得能量的过程。我们将在这章讨论三羧酸循环，它是由糖类和脂酸与氨基酸衍生的二碳乙酰残基降解的共同中心途径。下章将描述呼吸的最后阶段，即电子转移与氧化磷酸化。

三羧酸循环是嗜氧生物中几乎普遍存在的环状的反应序列。它由以乙酰辅酶 A 的乙酰基为燃料的多酶体系所催化，并破坏乙酰基使成二氧化碳和氢原子。后者通过一序列传递电子的蛋白质被引到分子氧，使氧还原成水。

我们还将在这章描绘出葡萄糖氧化的第二种途径，即磷酸葡萄糖酸通路的轮廓，它是生物合成反应所需还原力的来源之一，而且也是戊糖和其它糖类合成与降解的途径。

### 发酵与呼吸的能学

酵解作用只放出葡萄糖分子结构中潜在化学能量的很小一部分。比较无氧酵解与葡萄糖的完全氧化表明，若葡萄糖分子完全氧化成  $\text{CO}_2$  和  $\text{H}_2\text{O}$ ，则放出的能量多得多。

酵解：葡萄糖  $\longrightarrow$  2 乳酸

$$\Delta G^\circ = -47.0 \text{ 千卡/克分子}$$

完全氧化：葡萄糖 + 6  $\text{O}_2 \longrightarrow$  6  $\text{CO}_2$  + 6  $\text{H}_2\text{O}$

$$\Delta G^\circ = -686.0 \text{ 千卡/克分子}$$

当细胞通过酵解序列无氧降解葡萄糖则生成乳酸，它仍含有原来葡萄糖分子所含的大部分能量，不能进一步利用。另一方面，在有氧条件下葡萄糖降解不停顿在乳酸阶段而仍继续进行，使酵解产物完全氧化成  $\text{CO}_2$  与  $\text{H}_2\text{O}$ ，因而放出葡萄糖分子潜在能量的其余部分。

### 呼吸作用的流程

图 17-1 画出呼吸作用的流程。在分解代谢第 II 阶段中从糖、脂酸与氨基酸的氧化衍生出来的乙酰 CoA (第十四章) 现在进入第 III 阶段中的三羧酸循环。就是在这个循环里乙酰 CoA 的乙酰基被酶促降解成两分子  $\text{CO}_2$  与四对氢原子(以结合形式存在)。后者(或相应的电子)则注入一系列电子载体组成的呼吸链。在接着发生的电子转移到分子氧的过程中大量自由能随着下降，大部分能在氧化磷酸化过程中由于 ADP 的磷酸化产生 ATP 而得到保存。

与酵解的直线序列反应相反三羧酸循环是环状性质的。三羧酸循环的每一轮迴里(图 17-2)，一分子乙酸(两个碳原子)以乙酰-CoA 形式与一分子四碳化合物草酰乙酸缩合，形成六碳三羧基化合物柠檬酸。柠檬酸然后通过一个反应序列产生两分子  $\text{CO}_2$  并重新产生四碳草酰乙酸。又从草酰乙酸与另一乙酰 CoA 作用开始循环的另一个轮迴。因

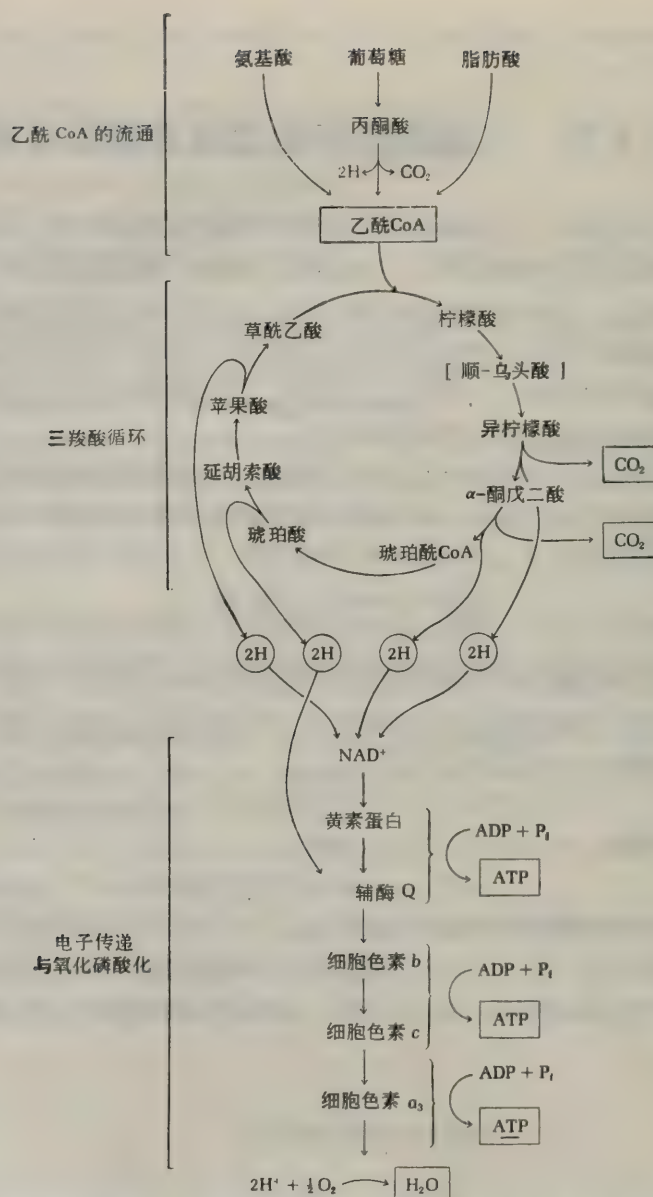


图 17-1 呼吸作用的流程图。动员乙酰 CoA 并在分解代谢第 II 阶段收集之。然后进入第 III 阶段,其内容为三羧酸循环与电子传递以及和它偶联的氧化磷酸化,方框内表示呼吸的终末产物。

此在循环的每一个轮回里一分子乙酸进去,两分子  $CO_2$  产生,并用去一分子草酰乙酸以形成柠檬酸,但是在循环的末尾草酰乙酸又重新发生。因此在循环进行中没有草酰乙酸的净消失。若是没有旁反应消除草酰乙酸,则一分子草酰乙酸就能够引起无限乙酸分子的氧化。故三羧酸循环从两种意义上看都有催化性质。循环的每单独一步当然是由特有的酶催化的,这和在所有酶体系中一样正确,但在这一催化水平之上还有循环中间产物本身的催化效应:即一分子草酰乙酸或在循环中它的任何前身物都能促进许多乙酸分子的氧化。



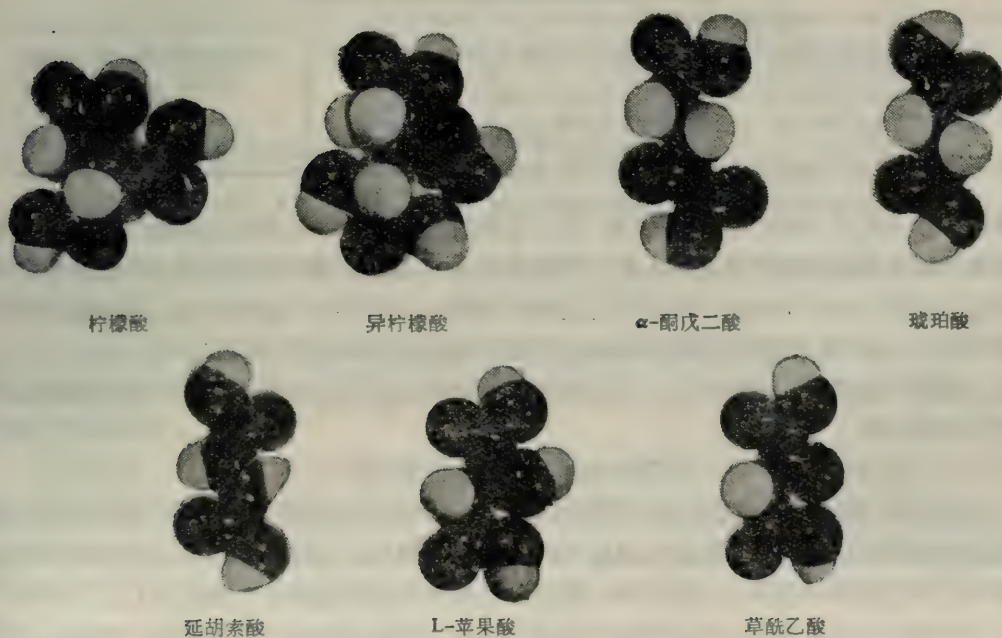
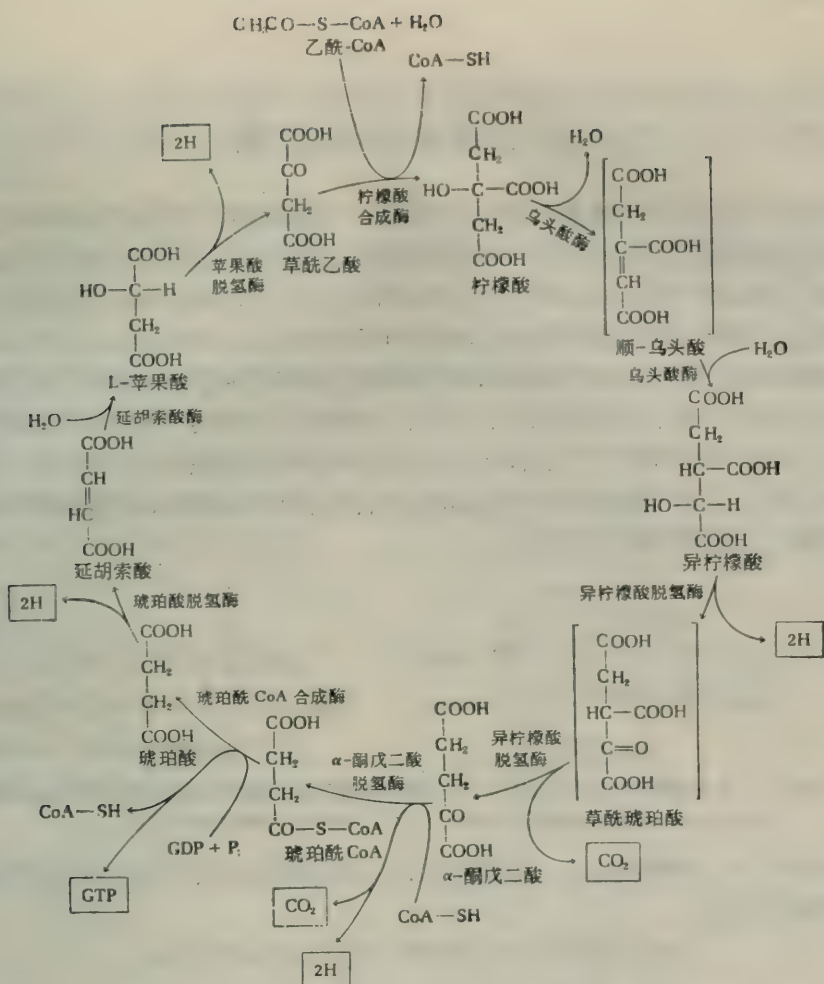


图 17-2 三羧酸循环。其中间产物都以游离酸表示，终末产物 ( $2\text{CO}_2$ 、4 对 H 原子和 GTP) 都在框中。假定不发生副反应，则由于它是对称的，生成的琥珀酸将产生延胡索酸、苹果酸和草酰乙酸，它们所含来自于乙酰 CoA 的碳在所有位置上数量都相等。中间产物的实体模型表示在循环下面。

## 三羧酸循环的发现

1937 年 N. A. Krebs 首先借用它的原名“柠檬酸循环”提出三羧酸循环。这是推理与实验的光辉成果，可与现代生物学经典研究并驾齐驱。由于它对分析其它代谢途径是一个富于影响和有创造性的模型，有必要简单地再介绍发现循环的研究轮廓。

首先必须作一简短的回顾。从 1910—1920 时期 T. Thunberg, 以及 F. Battelli 和 L. S. Stern 的工作中，已经知道动物组织糜的无氧悬浮液能催化氢原子从某些已知存在于细胞内的有机酸，特别是琥珀酸、苹果酸与柠檬酸，转移到可还原的甲烯蓝染料上使它成为无色的还原形（图 17-3）。催化这些反应的酶称为脱氢酶类。几个研究者在本世纪三十年代初期用量气法测定组织糜悬液的氧利用率发现琥珀酸、延胡索酸、苹果酸和柠檬酸很快被分子氧氧化成二氧化碳。

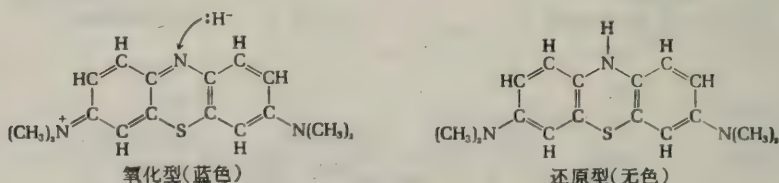


图 17-3 甲烯蓝的氧化型与还原型。由于还原型很易被分子氧所氧化，故用组织悬浮液去氧化甲烯蓝时必须要在无氧条件下进行，才能看到还原时的颜色变化。

1935 年 A. Szent-Györgyi 在匈牙利工作，将这些以及其它观察组合成琥珀酸氧化的一序列酶促反应：

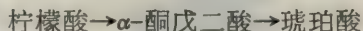


表 17-1 苹果酸对碎鸽胸肌肉呼吸的催化效应

加入的苹果酸，微克分子	氧化所加苹果酸需氧的计算值，微原子	氧总摄取量观察数值，微原子
1.0	6.0	47.2
2.0	12.0	69.4

特别有意义的是 Szent-Györgyi 发现，把小量草酰乙酸或苹果酸加到肌肉悬浮液中所诱发的氧的利用量远远超过氧化加入的二羧酸变成  $\text{CO}_2$  和水所需要的氧（表 17-1）。由这个和其它实验 Szent-Györgyi 作出结论，这些酸促进组织里某些内源性物质，很可能是糖原的氧化，一分子苹果酸或草酰乙酸促进了很多内源性物质的分子氧化。

稍后德国的 C. Martius 与 F. Knoop 发现动物组织可以通过下面序列将柠檬酸酶促氧化成琥珀酸



1936 年 Krebs 以这些发现为背景开始研究鸽飞翔肌肉糜悬液里各种二羧酸和三羧酸在氧化性代谢中的相互关系；这些肌肉的呼吸率很高。他特别注意寻找这些酸在葡萄糖氧化中的生物学意义。导致 Krebs 提出三羧酸循环的观察和推理摘录于下。

1. 首先，Krebs 指出肌肉悬液仅在氧化某些二羧酸如琥珀酸、延胡索酸、苹果酸、草酰



乙酸与  $\alpha$ -酮戊二酸, 以及仅仅某些三羧酸如柠檬酸、异柠檬酸和顺乌头酸(在中性 pH 这些酸当然是以其阴离子出现) 时才有极高速率。其它有机酸类如酒石酸与顺丁烯二酸不易被肌肉所氧化。

2. 不仅如 Szent-Györgyi 证明的那样少量的琥珀酸、延胡索酸、苹果酸与草酰乙酸对肌肉悬液氧化内源性糖或外加的丙酮酸有催化性的促进作用, 而且柠檬酸、顺乌头酸、异柠檬酸与  $\alpha$ -酮戊二酸也有此作用。

3. 丙二酸(图 17-4) 完全阻止上述有催化活性的任何三羧酸与二羧酸对丙酮酸氧化的促进。由于丙二酸是对琥珀酸脱氢酶有特异的竞争性抑制剂对作用于其它二羧酸与三羧酸的脱氢酶并无抑制作用, Krebs 作出结论认为, 琥珀酸脱氢酶氧化琥珀酸成为延胡索酸必然是涉及到能够促进丙酮酸氧化的所有三羧酸与二羧酸的反应链中一个根本环节。(在这点上最好参阅图 17-5)

4. 若以草酰乙酸与丙酮酸和肌悬液在无氧条件下保温就形成柠檬酸。于是 Krebs 提出, 丙酮酸与草酰乙酸缩合成柠檬酸是二羧酸和三羧酸的已知

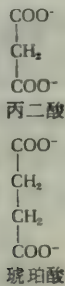


图 17-4 丙二酸, 琥珀酸脱氢酶的一种竞争性抑制剂(见图 8-11)。注意丙二酸和琥珀酸结构上的相似之处。

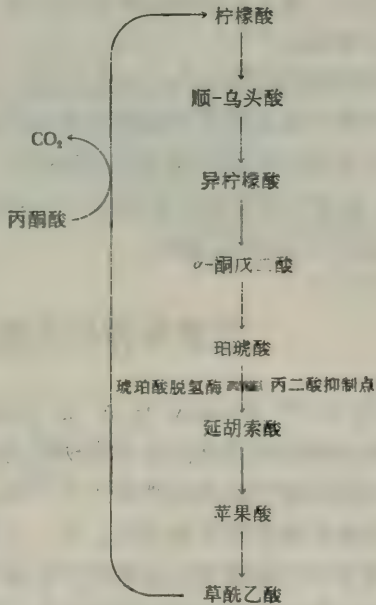


图 17-5 丙二酸阻断的位置。当琥珀酸脱氢酶受到阻断时, 则柠檬酸、顺乌头酸、异柠檬酸或  $\alpha$ -酮戊二酸的氧化都引起琥珀酸的堆积。丙二酸的抑制作用也阻断了琥珀酸脱氢酶的逆作用。由于延胡索酸转变成琥珀酸, 故 Krebs 氏提出延胡索酸氧化终末产物草酰乙酸与丙酮酸作用以生成柠檬酸, 它是琥珀酸的前身物。

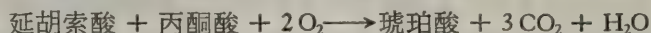
的酶促反应借以能排成环状序列的那个缺少的环节(图 17-5)。下面的实验是对这一假说的严格试验。

5. Krebs 发现若将丙二酸加到肌悬液以抑制琥珀酸脱氢酶, 则正如根据图 17-5 环状公式来推测的一样, 外加的柠檬酸、异柠檬酸、顺乌头酸、或  $\alpha$ -酮戊二酸的氧化都引起琥珀酸定量地积累。

6. 在有丙二酸毒害的肌肉中, 延胡索酸、苹果酸或草酰乙酸也引起琥珀酸定量地积累。这一重要发现清楚地证明必然存在着一个与琥珀酸脱氢酶无关的延胡索酸通过氧化转变成琥珀酸的途径。因此这些发现强有力地支持 Krebs 关于延胡索酸通过草酰乙酸与柠檬酸而成为琥珀酸这个氧化途径的假说, 并且确定了反应的总序列是环状的。

7. Krebs 然后又发现当用丙二酸阻断了丙酮酸的利用时可以用增加草酰乙酸的浓度

解除或克服抑制作用。在这种情况下每消耗一克分子丙酮酸时就有一克分子草酰乙酸消失。他对这种现象作如下解释。在没有受到抑制的环里假如环的每一轮迴都再生出草酰乙酸,当然会预期一克分子草酰乙酸能促进许多克分子丙酮酸的消除。然而,当用丙二酸使环毒化后草酰乙酸再也不能再生了。在这种情况下移除每一克分子丙酮酸需要一克分子草酰乙酸以生成柠檬酸,后者被氧化成琥珀酸。由于丙二酸阻断的结果于是琥珀酸堆积。因此用丙二酸毒化了的肌肉中有下述总反应发生:



8. Krebs 证明他提出的环里每一个酶促反应的速度都高到足以说明组织利用丙酮酸和氧的总速度。他因此作出结论,这一系列反应如果不是肌肉里丙酮酸氧化的唯一途径也是主要的途径。

根据这些简单而精密的实验和论据, Krebs 提出柠檬酸循环是肌肉里糖氧化的主要途径。因为若干年来对于柠檬酸是否为丙酮酸与草酰乙酸反应中形成的第一个三羧酸还不能肯定,故循环的名称改为三羧酸循环。正如后来知道的柠檬酸实际上是形成的第一个三羧酸,但待到完全已经证明时,十多年的时间又已过去。今天“三羧酸循环”与“柠檬酸循环”这两个名词可以通用。

### 三羧酸循环的酶类在细胞内的部位

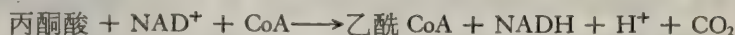
1948年 E. P. Kennedy 与 A. L. Lehninger 发现,从大鼠肝匀浆通过差速离心法获得分离出来的线粒体并悬浮在含有磷酸、腺苷酸和  $\text{Mg}^{2+}$  的缓冲基质中,能催化丙酮酸的氧化,而且胞质的可溶部分消耗了分子氧。分离的肝线粒体消耗氧和利用丙酮酸的总速率刚好与完整肝细胞呼吸率相符。另一方面,核、微粒体与胞质的可溶部分却无活性。因此肝线粒体含有三羧酸循环必需的所有酶类以及传递电子必需的组分。到今天为止,所有检查过的动物和植物细胞里线粒体是三羧酸循环反应的场所。

三羧酸循环的酶促反应在线粒体内部隔室之内进行。循环的某些酶存在于内部隔室的可溶基质里,而另一些则连接在线粒体内膜上,而且不容易以可溶的形式提取。有些三羧酸循环酶类,特别是顺乌头酸水化酶、对 NADP 有特异性的异柠檬酸脱氢酶、延胡索酸酶与苹果酸脱氢酶也存在于某些组织的胞汁里。

### 丙酮酸氧化成乙酰 CoA

1937年三羧酸循环提出以后从丙酮酸与草酰乙酸生成柠檬酸的精确途径便成为许多研究的课题。这问题直到 1948—1950 才解决。丙酮酸首先氧化失去  $\text{CO}_2$  变成乙酰 CoA,它然后与草酰乙酸通过酶促反应生成柠檬酸。

由丙酮酸脱氢酶复合体催化的丙酮酸氧化成乙酰 CoA 是 L. J. Reed 和他的同事揭示的。其总方程式为

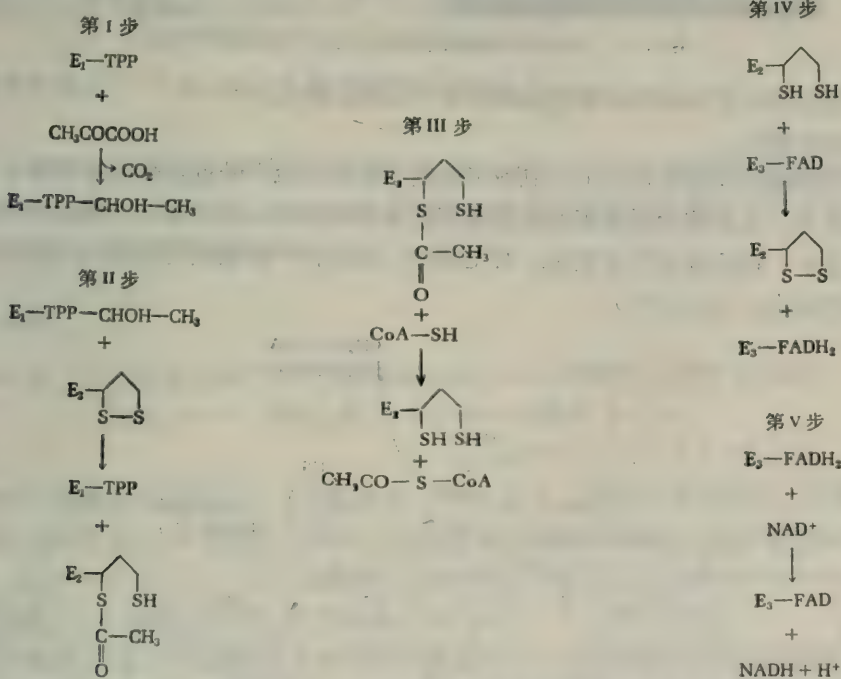


$$\Delta G^\circ = -8.0 \text{ 千卡/克分子}$$

这一反应在动物组织里是不可逆的,它本身并非三羧酸循环的一部分,但它是所有糖类



丙酮酸氧化脱羧成为乙酰 CoA 与  $\text{CO}_2$  需要有三种不同的酶和五种不同的辅酶组织成一个多酶复合体。这一复合体所促进的反应步骤用图 17-6 列出。第 I 步由丙酮酸脱氢酶催化, 它的辅基就是硫胺素焦磷酸。丙酮酸脱羧得到  $\text{CO}_2$  和硫胺素焦磷酸噻唑环上的  $\alpha$ -羟乙基衍生物, 这一反应和生醇发酵过程中涉及到的丙酮酸非氧化性的脱羧作用相同、或相似。第 II 步羟乙基脱氢, 且形成的乙酰基转移到硫辛酸碳 6 的硫原子上, 硫辛酸是构成复合体的第二种酶, [二氢硫辛酰转乙酰酶(正式名称为硫辛酸乙酰转移酶)] 的共价结合的辅基, 从硫胺素焦磷酸的羟乙基上转移一对氢原子(或电子当量)到硫辛酸二硫键上使它变成还原型或二硫型, 亦即二氢硫辛酸。第 III 步乙酰基从二氢硫辛酸的硫辛酰基转移到辅酶 A 的巯基上; 由是生成的乙酰 CoA 离开酶复合体而游离存在。第 IV 步二氢硫辛酰转乙酰酶的硫辛基二硫形式再被氧化成二硫形式, 二个氢原子转移到复合体的第三种酶, 通常称为二氢硫辛酰脱氢酶(正式名称为硫辛酰胺脱氢酶)上, 此酶可还原的辅基即紧密结合的黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)。所产生与酶仍保持结合的  $\text{FADH}_2$  在第 V 步内被  $\text{NAD}^+$  再氧化生成 NADH。(图 17-6)



$E_2$  = 二氢硫辛酰乙酰转移酶  $E_3$  = 二氢硫辛酰脱氢酶。

• 393 •

5个丙酮酸脱氢酶激酶分子(分子量=62,000);结合不那么紧的有几个丙酮酸脱氢酶磷酸酶(分子量100,000)分子。后两种酶起调节作用,它们的功用将述于下。丙酮酸脱氢酶复合体处在线粒体基质中。

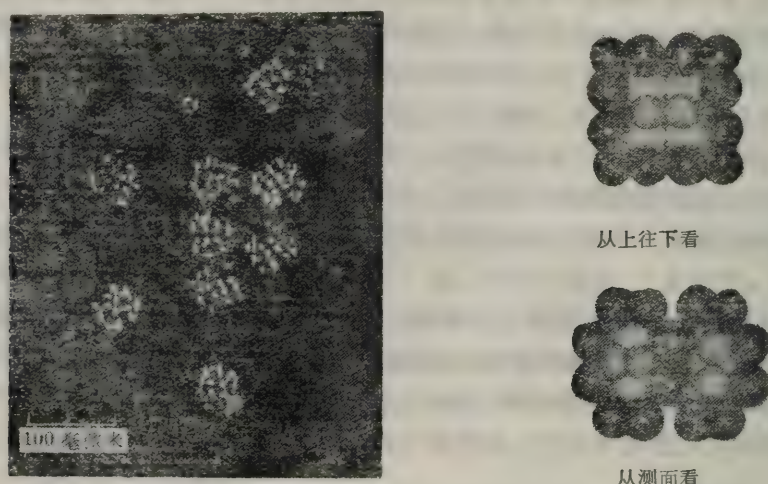


图 17-7 大肠杆菌丙酮酸脱氢酶显示出其亚基结构的电镜图

大肠杆菌细胞里的丙酮酸脱氢酶复合体的成分稍有不同;图 17-7 中展示大肠杆菌酶复合体的电镜图。

在丙酮酸脱氢酶复合体中二氢硫辛酰转乙酰酶的硫辛酰赖氨酰长侧链像一只“摇臂”一样起作用,从丙酮酸脱氢酶的结合硫胺素焦磷酸把羟乙基转移到二氢硫辛酰转乙酰酶的活性点上,羟乙基就在此氧化。所生成的乙酰基再一次由摇臂转移到二氢硫辛酰脱氢酶的活性点上。(图 17-8)

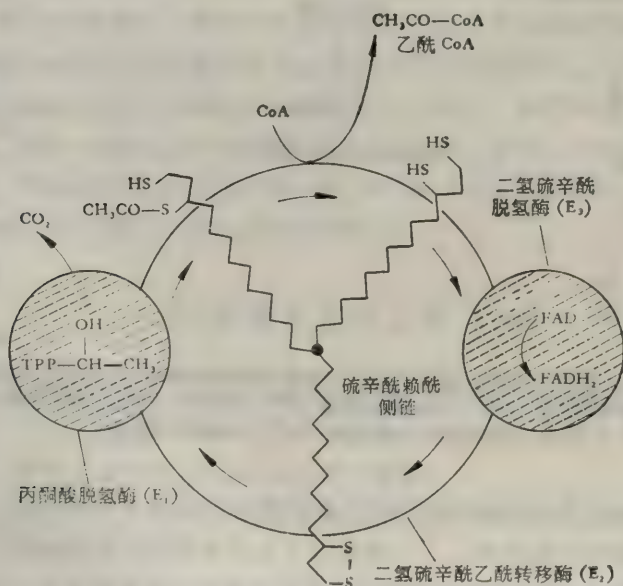


图 17-8 硫辛酰赖氨酰基在丙酮酸脱氢酶复合体中的作用。二氢硫辛酰转乙酰转移酶 ( $E_2$ ) 的长硫辛酰赖氨酰侧链是从丙酮酸脱氢酶 ( $E_1$ ) 转移电子到二氢硫辛酰脱氢酶  $E_3$ , 且从  $E_1$  转移乙酰基到辅酶 A 的摇臂。



丙酮酸脱氢酶复合体具有特征性地由三价砷如亚砷酸所抑制,砷与转乙酰酶的二氢硫辛酰两个巯基都起作用产生无活性的环状砷衍生物。

ATP 和  $\text{Ca}^{2+}$  离子含量调节着丙酮酸脱氢酶复合体的活性。高度纯化的复合体与 ATP 一同保温就产生抑制,这是由于丙酮酸脱氢酶激酶的作用对复合体作了共价修饰的结果。此酶催化丙酮酸脱氢酶的一个亚基的依赖 ATP 的磷酸化作用,此作用需要有  $\text{Mg}^{2+}$ 。所生成的磷酸化了的脱氢酶无催化活性。无活性的磷酸化了的丙酮酸脱氢酶通过丙酮酸脱氢酶磷酸酶的作用又可以重新恢复活性,此酶在有  $\text{Mg}^{2+}$  存在时能催化抑制性磷酸根的水解移除。此反应大都由  $\text{Ca}^{2+}$  激活。激酶与磷酸酶都存在于完全的丙酮酸脱氢酶复合体,并因此而行使调节亚基的功能。

丙酮酸脱氢酶复合体的活性的调节作用概述如下。每当三羧酸循环及氧化磷酸化的终末产物——富于能量的 ATP——堆积到高水平的时候,丙酮酸脱氢酶复合体通过它的激酶使它磷酸化而关闭,降低了循环燃料乙酰 CoA 生成的速度,因而也降低了继之而来的 ATP 的形成。然而每当 ADP 浓度高而且有足够的丙酮酸时,则丙酮酸脱氢酶复合体又通过无活性脱氢酶的脱磷酸作用而开动起来,  $\text{Ca}^{2+}$  能加强此反应。

我们即将叙述丙酮酸氧化脱羧终末产物乙酰 CoA。

## 三羧酸循环的反应

1937 年原假设的三羧酸循环是一骨架。此后以从催化各个步骤的酶类的高纯度制品的研究中得来的大量细节作了补充。而且对循环中反应的立体化学给予极大的注意。图 17-2 展示的是今天所了解的循环。

### 柠檬酸合成酶

循环中第一个三羧基中间产物柠檬酸是由乙酰 CoA 与草酰乙酸缩合而成:



$$\Delta G^0 = -7.7 \text{ 千卡/克分子}$$

这一反应由柠檬酸合成酶所催化,此酶由 S. Ochoa 发现,最初称为缩合酶。此酶(分子量 100,000)催化乙酰 CoA 的甲基与草酰乙酸的羧基之间的醛醇缩合,以及硫酯键的水解生成游离 CoA—SH (图 17-9)。在活性点上推想有柠檬酰 CoA 以非离解中间产物生成;合成的柠檬酰 CoA 由酶水解产生柠檬酸和 CoA。

因为柠檬酰 CoA 高能硫酯键水解的放能性质( $\Delta G^0 = -7.7$  千卡)故柠檬酸合成酶反应极大地趋向柠檬酸生成的方向。柠檬酸合成酶也催化从氟乙酰 CoA 生成氟柠檬酸的作用。这是致死合成的一个例子,因为氟乙酸本身无毒而氟柠檬酸却是三羧酸循环中下一个酶——乌头酸酶——的强烈抑制剂。

柠檬酸合成酶反应是三羧酸循环的首要的步骤;其速度主要决定于乙酰 CoA 与草酰乙酸的有效量以及琥珀酰 CoA (见后)的浓度,后者与乙酰 CoA 竞争而且抑制柠檬酸合成酶。虽然此酶也可由 ATP、NADH 及长链脂酰 CoA 酯所抑制,但并不明确这些效应是否有生理意义。

## 柠檬酸转变成异柠檬酸

乌头酸水化酶，更常称作乌头酸酶，催化柠檬酸通过与酶结合的中间产物顺-乌头酸而将柠檬酸可逆地相互转化(图 17-10)：

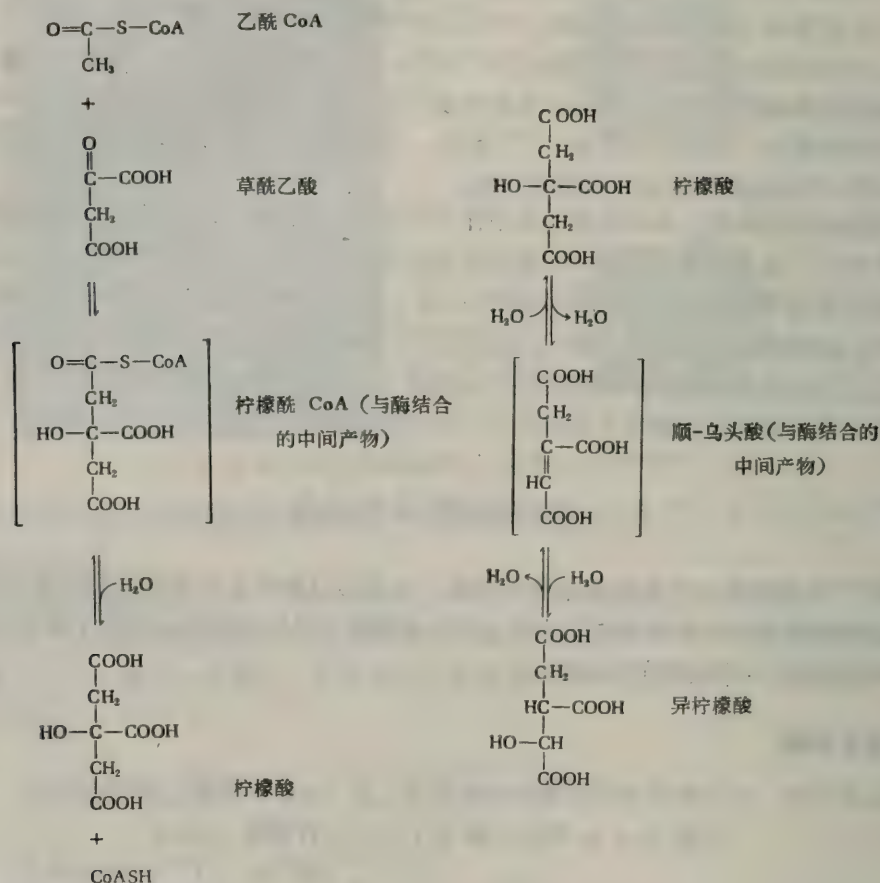
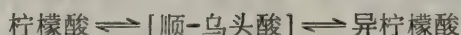


图 17-9 柠檬酸合成酶反应

图 17-10 乌头酸酶反应



在 pH 7.4 和 25°C 时平衡混合物中含有柠檬酸 93%，而异柠檬酸仅 7%。然而异柠檬酸在循环中下一步很快就氧化了，因此把乌头酸酶反应拉向异柠檬酸的生成。乌头酸酶含 Fe(II)，且需要有如半胱氨酸或还原型谷胱甘肽那样的硫醇。此酶催化 H<sub>2</sub>O 可逆地加入顺-乌头酸的朝两方向反应的双键，一个方向产生柠檬酸另一个产生异柠檬酸。通常顺-乌头酸作为与酶结合的中间产物而起作用；它很慢地离开活性点。从巧妙设计的用氧标记底物的实验中推论出 H 与 OH 总是以互为反式加到顺-乌头酸的双键上(图 17-11)，以形成柠檬酸或异柠檬酸。下面将进一步讨论乌头酸酶的立体化学。

乌头酸酶反应的机制曾引起很大的注意，因为能与柠檬酸形成稳定的螯合物的 Fe(II) 离子是酶的作用所必需的。乌头酸酶作用的“亚铁轮”假说示于图 17-12。

动物组织中乌头酸酶以两种同功酶形式存在，一在线粒体中，而另一则在胞汁部分。



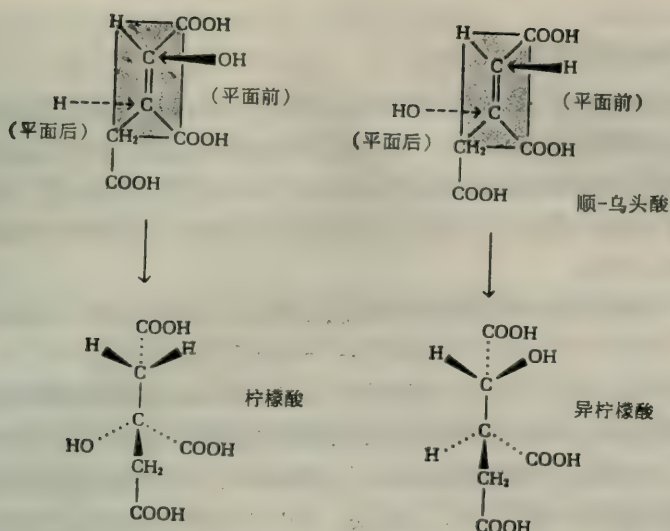


图 17-11 向顺-乌头酸作立体特异的反式加水。顺-乌头酸分子中六个中心原子形成平面,用两种不同方式从平面的前方和平面的后方加进水,如图所示以形成柠檬酸和异柠檬酸[引自 J. P. Glusker. in P. D. Boyer (ed.), *The Enzymes*, Vol. 5, p. 421. 1971]

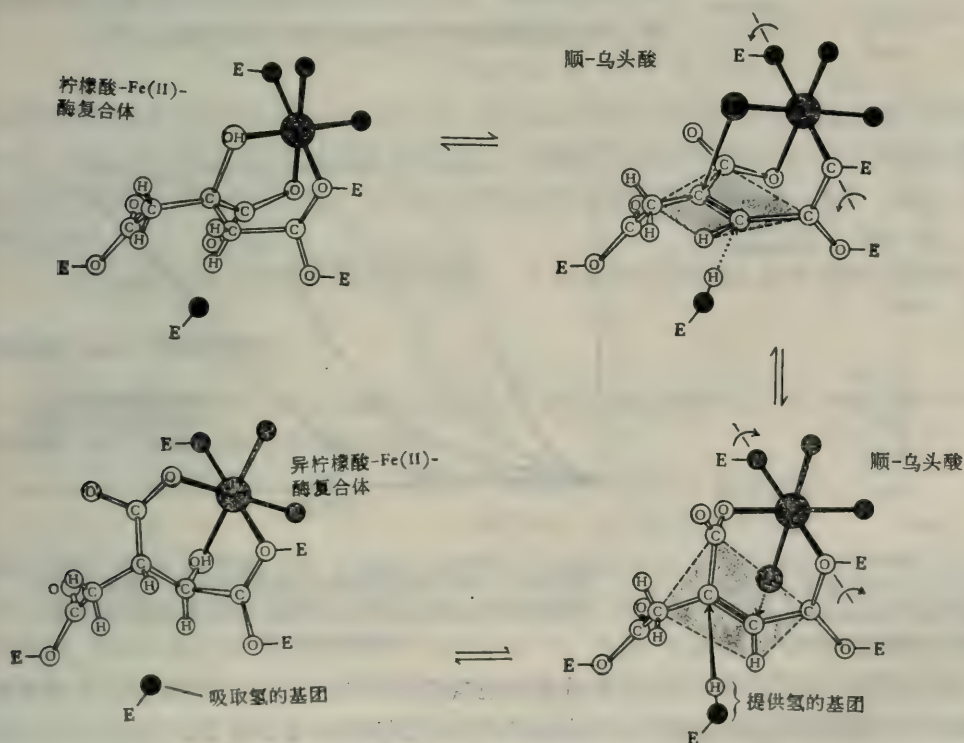
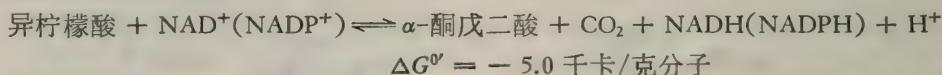


图 17-12 假设的乌头酸酶的“亚铁轮”机制,设想顺-乌头酸在三点上与标记E的酶结合,也与在活性中心的必需 Fe(II) 结合,用虚线环绕着的表示顺-乌头酸的双键的平面(见图 17-11)。通过部分转动亚铁轮,从上面加 OH 而从下面加 H 就产生柠檬酸,若从下面加 OH (虚线箭头),从上面加 H,把亚铁轮部分朝另一方向转动,就会生成异柠檬酸。这一假说是从用 X 光分析三羧酸循环的 Fe(II) 复合体的结果中衍生出来的。[引自 I. P. Glusker. in P. D. Boyer (ed.), *The Enzymes*, Vol. 5, p. 434. 1971]

## 异柠檬酸氧化成 $\alpha$ -酮戊二酸

由于异柠檬酸氧化成  $\alpha$ -酮戊二酸有其不平常的实验历史而具有特殊意义。大多数微生物和高等动植物组织里含有两个类型的异柠檬酸脱氢酶。多年来对于究竟是哪一类酶催化三羧酸循环内的异柠檬酸氧化成  $\alpha$ -酮戊二酸有过激烈的争论。异柠檬酸脱氢酶的一种类型需要  $\text{NAD}^+$  作为电子受体, 而另一类型则需要  $\text{NADP}^+$ 。两类异柠檬酸脱氢酶所催化的总反应相同:



动物组织的线粒体中与  $\text{NAD}$  相连的和与  $\text{NADP}$  相连的异柠檬酸脱氢酶都存在, 但前者只存在于线粒体内, 而后者却既存在于线粒体也存在于胞汁中。现有的大多数证据都表明与  $\text{NAD}$  相连的异柠檬酸脱氢酶是三羧酸循环内异柠檬酸氧化的主要催化剂。因为与  $\text{NAD}$  相连的酶是一种变构酶, 它需要  $\text{ADP}$  作为特异的激活调节剂, 故对  $\text{NAD}$ -与

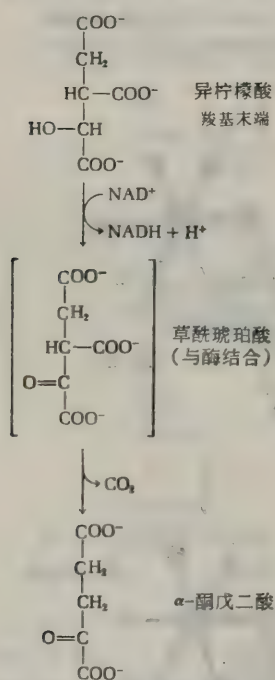


图 17-13 异柠檬酸氧化成  $\alpha$ -酮戊二酸。草酰琥珀酸(括弧)可能是一个酶结合的中间产物。

对  $\text{NADP}$  特异的异柠檬酸脱氢酶之间的区别长期内一直不明白。直到  $\text{ADP}$  的刺激效应被发现以前, 以为与  $\text{NAD}$  相连的脱氢酶, 如在线粒体提出物中测出的那样仅略有活性, 不能说明已知的异柠檬酸氧化的高速度。

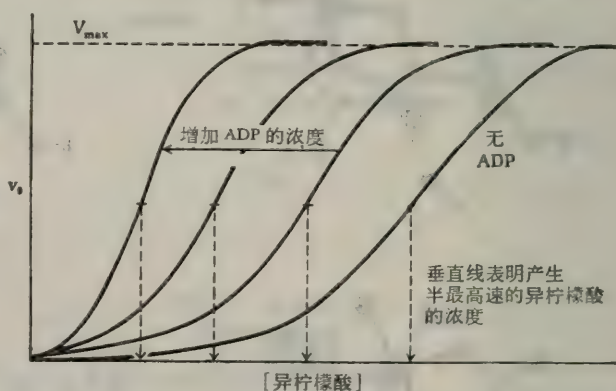


图 17-14  $\text{ADP}$  对异柠檬酸脱氢酶的变构刺激。增加  $\text{ADP}$  浓度引起  $K_M$  表面值下降而无  $V_{\max}$  的变化, 因此当底物浓度低时激活了酶。

线粒体的对  $\text{NAD}$  有特异性的异柠檬酸脱氢酶需要  $\text{Mg}^{2+}$  以保持活性。它有 8 个相同亚基, 分子量约 380,000。因为  $\beta$ -羧基以  $\text{CO}_2$  形式消失是一个高度放能过程, 所以反应进行时  $\Delta G^\circ$  大量下降。很可能草酰琥珀酸(图 17-13)在反应中是一个与酶结合的中间产物。当动物组织对  $\text{NAD}$  有特异性的异柠檬酸脱氢酶由  $\text{ADP}$  激发时,  $\text{ADP}$  并无酶促变化且在反应末仍可再回收。没有其它 5'-磷酸核苷( $\text{dATP}$  除外)能激活此酶,  $\text{AMP}$  或  $\text{ATP}$  都不能。从它的反应动力学特点看此酶的变构本质也是很明显的。图 17-14 展示出作为  $\text{ADP}$  浓度的函数的以速度对异柠檬酸浓度作出的图。在类似的实验里, 已经发



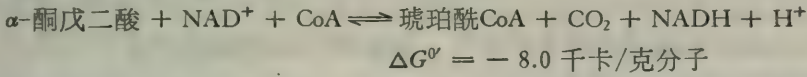
现增加 ADP 的浓度也会增加酶对  $\text{NAD}^+$  明显的亲和力。另一方面异柠檬酸脱氢酶将强烈地被负调节剂 NADH 及 ATP 所抑制。在任何代谢条件下只要细胞中 ADP 浓度增加（这很可能是在需能反应中 ATP 极端高速的分解引起的），随之而来的就有异柠檬酸氧化速度的增加。当细胞中 ATP 浓度再升高时，ADP 浓度一定下降，这一变化将使异柠檬酸脱氢酶关闭。此外，线粒体内 NADH 的任何堆积也能关闭异柠檬酸的氧化。异柠檬酸脱氢酶在大多数情况下似乎不是循环中最主要的限速步骤，然而它可能涉及一种次要的调节功能。

与 NAD 相连的异柠檬酸脱氢酶反应对异柠檬酸的四个可能立体异构体之一，如苏-D<sub>2</sub>-异柠檬酸，有立体特异性，而且对  $\text{NAD}^+$  也有，因为此酶从异柠檬酸转移一个氢原子仅仅到  $\text{NAD}^+$  的烟酰胺环的一边，即 A 边。

与 NADP 相连的异柠檬酸脱氢酶在某些情况下可能参与线粒体对异柠檬酸的氧化，它不像是一个变构酶。

### $\alpha$ -酮戊二酸氧化成琥珀酰 CoA

$\alpha$ -酮戊二酸氧化成琥珀酰 CoA 是由 $\alpha$ -酮戊二酸脱氢酶复合体完成的，在动物细胞里是生物学上一种不可逆的反应

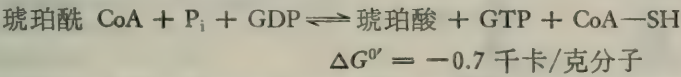


这反应与丙酮酸氧化成乙酰 CoA 和  $\text{CO}_2$  相似，且按同一机制以硫胺素焦磷酸、硫辛酸、Co-A，FAD 和  $\text{NAD}^+$  作为辅酶参加而进行。 $\alpha$ -酮戊二酸脱氢酶复合体与丙酮酸脱氢酶复合体的结构和性质都极相似。它已从动物组织和大肠杆菌分离出来，其粒子量为  $2.1 \times 10^6$  道尔顿。

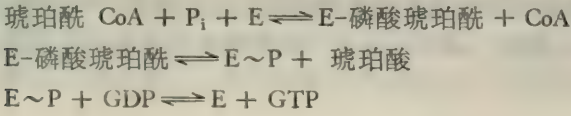
$\alpha$ -酮戊二酸氧化步骤的产物为琥珀酸上一个羧基的高能硫酯，即琥珀酰辅酶 A。

### 琥珀酰 CoA 的脱酰作用

琥珀酰 CoA 失去它的 CoA 基团不是通过简单的水解，而是通过与二磷酸鸟苷(GDP)和磷酸一同作用的一种保存能量的反应。



催化此反应的酶，琥珀酰 CoA 合成酶，它消耗了琥珀酰 CoA 的高能硫酯键而导致从 GDP 和  $\text{P}_i$  生成 GTP 的高能磷酸键(图 17-15)。从动物组织来的酶对以 GDP 为磷酸受体有特异性，而从大肠杆菌来的酶则利用 ADP。P. D. Boyer 及其同事的研究揭示在此反应中生成一个酶与磷酸共价结合的中间产物。当没有 GDP 而以酶与 $^{32}\text{P}_i$ 、琥珀酰 CoA 和  $\text{Mg}^{2+}$  一同保温时，或在没有琥珀酸而与用 $^{32}\text{P}$  标记的 GTP 保温时，酶蛋白的一个组氨酸残基被磷酸化了。3-磷酸组氨酸残基(图 17-16)在总反应的最后一步里可能将其磷酸根提供给 GDP。这个以及其它证据提出下述顺序，其中 E 代表酶蛋白：



在这公式中磷酸琥珀酰是琥珀酸与磷酸的混合酸酐，设想它是在活性点上生成且能将其磷酸根转移到酶的组氨酸残基的咪唑环第3位置上，与酶结合的磷酸琥珀酰与外加的游离磷酸琥珀酰不易交换。

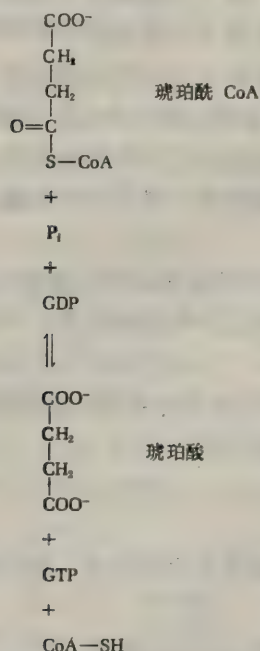


图 17-15 琥珀酰 CoA 的脱酰作用

此反应中形成的 GTP 在核苷二磷酸激酶反应中将其末端磷酸根给予 ADP 以生成 ATP:



GTP 与 ATP 的水解标准自由能大致相同。

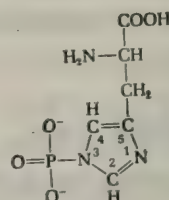


图 17-16 3-磷酸组氨酸的结构

与琥珀酰 CoA 脱酰作用偶联的 GTP (或 ATP) 的生成作用称为底物水平的磷酸化作用, 以表示与呼吸链偶联的磷酸化有区别。在酵解过程中与 3-磷酸甘油醛氧化作用偶联的 ATP 的生成是底物水平磷酸化作用的另一个例子。在  $\alpha$ -酮戊二酸氧化成琥珀酸时, GTP 的生成不被 2,4-二硝基酚阻断, 而 2,4-二硝基酚却是氧化磷酸化特有的解偶联剂。

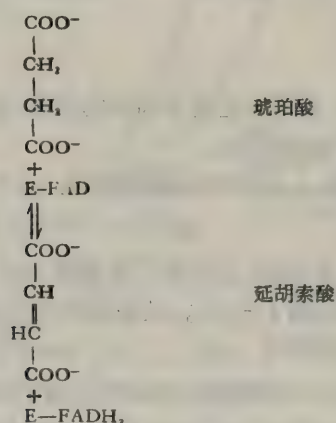


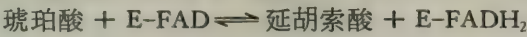
图 17-17 琥珀酸脱氢作用。E 代表琥珀酸脱氢酶蛋白。

琥珀酰 CoA 能被三羧酸循环辅助功能中的某些重要的其它反应脱酰成琥珀酸; 这将在它处叙述。从图 17-2 看到来自  $\alpha$ -酮戊二酸脱氢酶反应的琥珀酸含有输送到循环中来的乙酰 CoA 上两个碳原子。



琥珀酸脱氢酶

琥珀酸由含有共价结合的黄素腺嘌呤二核苷酸的黄素蛋白琥珀酸脱氢酶氧化生成延胡索酸(图 17-17)。此酶与内线粒体膜紧密结合,颇难从膜上以可溶形式抽提,花费了多年的紧张研究以分析其成分、性质与机制。它的可还原的辅酶 FAD 在反应中作为氢受体而起作用

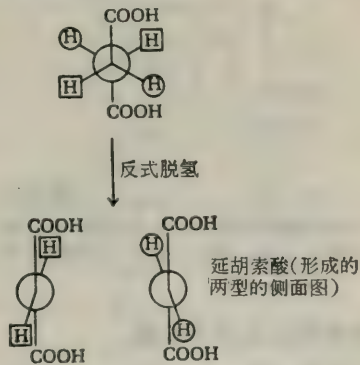


还原型酶能对各种人造电子受体,如可还原的染料等,提供电子;它正常的电子受体还不清楚。关于它的及其它黄素脱氢酶类的其它性质将在别处讨论。

从牛心线粒体中,用能破坏水的氢键结合结构的过氯酸钠溶液抽提出来的琥珀酸脱氢酶,分子量约 1 00,000,且含有一分子 FAD,八个铁原子,以及八个对酸不稳定的硫原子。高度纯化的酶似乎有两个亚基,一个的分子量 30,000,一个为 70,000。琥珀酸脱氢酶较大的亚基含有 FAD、四个铁原子和四个对酸不稳定的硫原子。较小亚基是一种铁-硫蛋白,含有四个铁原子和四个对酸不稳定的硫原子。FAD 是共价结合的,而且在大亚基的胰液消化过程中它可放出。FAD 是通过核黄素的 8-甲基与蛋白质上组氨酸残基的咪唑环上氮 3 位置相连接的。一个经胰液消化得来含有 FAD 和 23 个残基的肽的氨基酸顺序已经确定。琥珀酸脱氢酶的两个亚基上铁原子在从琥珀酸转移电子到呼吸链去的过程中可能都进行 Fe(II)-Fe(III) 价数的变化。已经知道有许多铁-硫蛋白在电子转移反应中起作用。

琥珀酸脱氢酶从琥珀酸移去氢原子的立体化学已经详细研究过。一个重要的线索来自于对酶作用的分析,它对 L-氯代琥珀酸有脱氢作用而对 D-氯代琥珀酸则没有。从这一事实以及用氘 (<sup>2</sup>H) 作标记的同位素实验得出结论:此脱氢酶从琥珀酸亚甲碳原子上移去反式氢原子。(图 17-18)

从末端看琥珀酸。脱氢酶移去两个反或两个顺以生成图中的延胡索酸。从中央由碳-碳双键延伸出来的四个单键处在一个平面上。



琥珀酸的投影公式,相当碳原子以星号和圈标记。琥珀酸脱氢酶以相等速度移两个反或两个顺原子[仿改自 W. L. Alworth, Stereochemistry and Its Application in Biochemistry, p. 13. 1973]

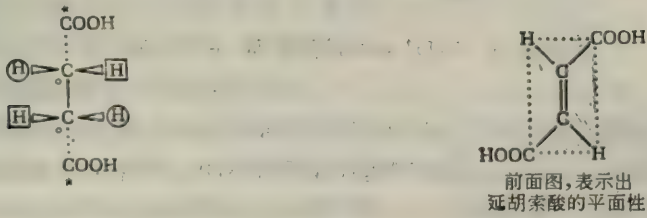


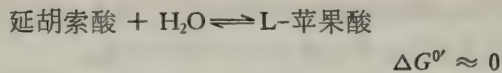
图 17-18 琥珀酸脱氢酶反应的立体化学

琥珀酸脱氢酶有一种变构酶的某些特点:它可由琥珀酸、磷酸、ATP 和还原型辅酶

Q激活；它又为极低浓度的草酰乙酸所抑制。然而并不明确这些影响是否对决定三羧酸循环总速度能起作用，因为线粒体内琥珀酸脱氢酶活性通常要比环中其它酶活性大，而且比电子传递链的活性大。这问题将在别处作进一步讨论。

### 延胡索酸的水化作用

延胡索酸可逆性水化作用生成 L-苹果酸。这是由延胡索酸水化酶，更常称为延胡索酸酶，所催化的：



已从猪心获得此酶的结晶体。这一反应在体内是完全可逆的。延胡索酸酶分子量约 200,000，且含有四条多肽链亚基，亚基分离状态时没有活性。它无需辅酶。ATP 降低酶对延胡索酸的亲和力。从研究影响延胡索酸酶活性率的因素中产生了分析酶动力学的某些极重要的实验的和数学的方法。

延胡索酸酶活性也有立体特异性，因为它只生成（与脱水）苹果酸的 L-立体异构物。用以氘标记的水对作用机制做立体化学研究已经揭示延胡索酸酶催化延胡索酸双键上 H— 和 —OH 的反式加成作用。延胡索酸虽是一个对称的分子，但 —OH 基只能加到双键的一边，以生成苹果酸的 L-立体异构物。（图 17-19）

前面图。延胡索酸分子的平面与视线相垂直

侧面图。延胡索酸分子的平面几乎与视线平行。

产物，赤-3-氘-L-苹果酸。氘在—OD与介质的氢离子进行交换时进入；氘与碳结合稳定。

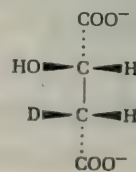
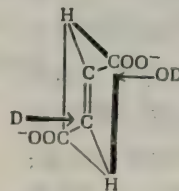
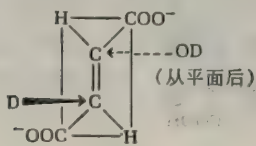
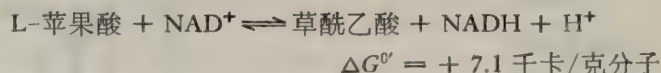


图 17-19 延胡索酸酶反应的立体化学

延胡索酸的四个取代基是在书页的平面上，重水 ( $\text{D}_2\text{O}$ ) 的 D 与 OD 基分别从平面的前面与后面去接近延胡索酸的双键。既然只生成一种异构体，则 —OD 基只能加到双键的一边以形成图中的立体异构体。

### 苹果酸氧化成草酰乙酸

在环的最后一个反应中与 NAD 相连的 L-苹果酸脱氢酶催化 L-苹果酸变成草酰乙酸的氧化作用：



虽然反应如所写的是吸能的，但在细胞里它很易朝前方进行，因为后续步骤里很快移除了反应产物草酰乙酸和 NADH。此酶仅微弱地还原 NADP。苹果酸脱氢酶反应对苹果酸的 L 立体异构物和  $\text{NAD}^+$  吡啶环的 A 侧有严格的立体特异性。高等动物细胞含有两种类型的苹果酸脱氢酶，一种在线粒体内，另一种在线粒体外的胞质中。

现在我们可以总结三羧酸循环一个轮回的产量。每进入一个乙酰基就有两个碳原子以二氧化碳出现，然而这些碳原子并非是以乙酰基进入的同一碳原子。酶促脱氢作用产

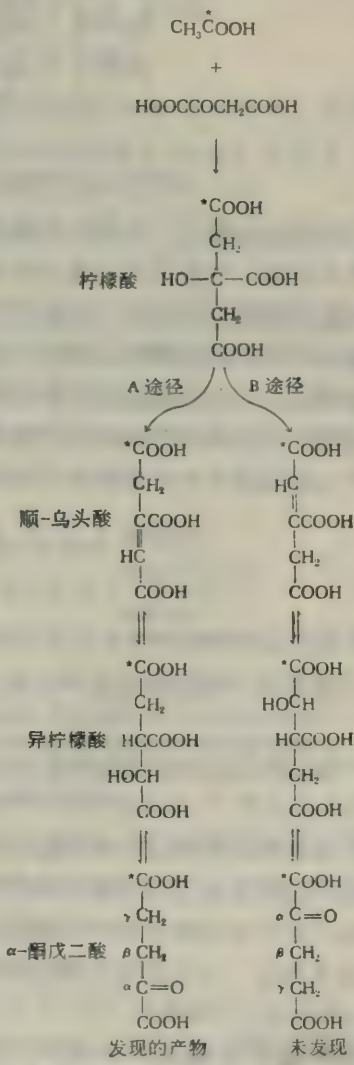


生四对氢原子;用去三对以还原  $\text{NAD}^+$ , 一对用以还原与琥珀酸脱氢酶结合的  $\text{FAD}$ 。这四对氢原子变成  $\text{H}^+$  离子,其相应的电子经过呼吸链运出与氧结合。

### 三羧酸循环的同位素试验

用同位素<sup>13</sup>C 或<sup>14</sup>C 标记三羧酸循环中的前身物与中间产物特有的碳原子所做的严格的同位素试验已经证明,在完整的细胞里三羧酸循环确实发生,而且能定量地说明糖、脂肪酸和氨基酸的氧化作用。然而某些最早的同位素实验产生了一个出乎意料的结果,引起许多有关循环中反应的途径和机制的争论。例如,用同位素碳(用星号标记)在羧基上作了标记的乙酸( $\text{CH}_3^*\text{COOH}$ )与正在进行环状氧化的组织悬浮液一同保温。既然乙酸在动物组织内可由酶促转化变成乙酰 CoA,则乙酰 CoA 的羧基碳原子在环状反应中的途径可以追索。随着乙酸被氧化的一段时间后从组织悬浮液中分离出三羧酸循环的各种中间产物。然后降解这些中间产物以确定同位素碳在每一种中间产物上的位置。以没有标记的草酰乙酸与标记了羧基的乙酸缩合,推想会产生标记了一个羧基的柠檬酸(图 17-20)。因为柠檬酸没有不对称碳原子,似乎是一个对称的分子,所以推测柠檬酸的两个末端羧基在化学上是无区别的。因此预期从标记乙酸生成的标记柠檬酸分子的一半应该产生同位素在  $\alpha$ -羧基上的  $\alpha$ -酮戊二酸,而另一半  $\alpha$ -酮戊二酸则同位素应在  $\gamma$ -羧基上(图 17-20)。然而,与此推想相反,对从组织悬浮液中分离出来的标记了的  $\alpha$ -酮戊二酸作同位素分析表明,开始以乙酸的羧基碳引进的同位素仅在  $\alpha$ -酮戊二酸的  $\gamma$ -羧基上发现,而不是  $\alpha$ -和  $\gamma$ -羧基上都有(图 17-20)。因此作出结论,柠檬酸本身或任何其它对称分子不可能是从乙酸到  $\alpha$ -酮戊二酸途径中的一个中间产物。如是假定从乙酸与草酰乙酸生成的第一个缩合产物是一个不对称的三羧酸,很可能是顺-乌头酸或异柠檬酸。

然而 A. Ogston 1948 年指出,柠檬酸虽然没有不对称碳原子,但柠檬酸合成酶与乌头酸酶的活性位点可能是不对称的。他特别提出乌头酸酶的活性位点对柠檬酸可能有两个结合点,不对称地排列着,因而柠檬酸必须在活性位点上造成一个“三点着陆”。柠檬酸的三个不同功能基然后才能够与活性位点上三个互补基特



异地相互作用(图 17-21)。然而我们今天已经知道,乌头酸酶对柠檬酸的不对称性利用是根据柠檬酸分子本身的立体化学性质而来的。

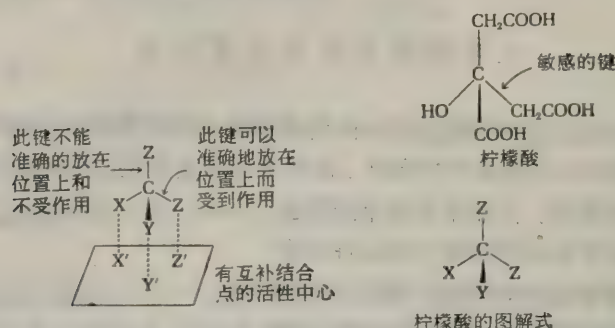


图 17-21 Ogston's 关于乌头酸酶对柠檬酸不对称作用的解释。然而要解释乌头酸酶对柠檬酸的作用并不必需柠檬酸的三点结合。见图 17-22 柠檬酸的三点结合。

我们已经知道有一个不对称碳原子的分子是手性(chiral)分子,因为它们以左手形和右手形存在。然而近代立体化学又认识了另一类分子,它们没有不对称碳原子,但有不称地起作用的潜在能力;故称它们为前手性分子(prochiral molecules)。柠檬酸是一种前手性分子,因为它的两半(图 17-22)具有彼此不能互相重叠的镜象关系,所以在立体化学上不相同。正如某些酶能区分各别对映体的分子一样(如区分 D-与 L-乳酸或 D-与 L-氨基酸),某些酶则能区分单个前手性分子的对映地不同部分。乌头酸酶就是这样一种酶。它只能与前手性柠檬酸分子的两半中之一结合并转化它。这就是为什么乌头酸酶作

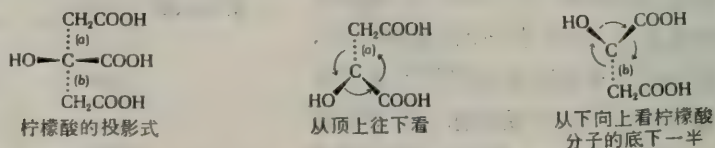


图 17-22 柠檬酸分子的前手性。顶部是柠檬酸的投影结构式,没有不对称碳原子。其次表明分子顶上一半的三个取代基的次序,如当(b)链垂直于并伸向书页,平面后面时的次序。底下是如当(a)链向书平面垂直并伸向其后面时分子底下一半中取代基的次序。柠檬酸分子两半中取代基,如箭头所示看来其次序是相对立的,故互为镜象。[仿改自 W. L. Alworth, Stereochemistry and Its Application in Biochemistry. p. 114, 1973]

用于从标记的乙酸生成的柠檬酸时所产生的异柠檬酸只有一个羧基被标记。已经用几种类型的同位素实验无可置疑地证实了,环中柠檬酸分子的两个一半是不相等的。然而,乌头酸酶的活性位点如何识别柠檬酸分子两半中之一而与它特异地结合的具体方式及几何关系尚不知道,还必须等待画出活性位点图。并不排除柠檬酸分子在活性位点上的三点着陆,只不过尚未证实。

从标记了  $\gamma$ -羧基的  $\alpha$ -酮戊二酸得出的琥珀酸最后所产生的标记苹果酸中有一半标记在  $\alpha$ -羧基上,另一半标记在  $\beta$ -羧基上。在这个反应中琥珀酸分子本身对称地起作用,然而应该注意琥珀酸脱氢酶和延胡索酸酶在它们的作用中都是有立体特异性的。

用其它标记前身物如  $\text{CH}_3\text{COOH}$ 、 $\text{CH}_3\text{COCOOH}$  和  $\text{HCO}_3^-$  (见后)所做的试验发现,三羧酸循环所得到的有标记的环中间产物其同位素位置不仅与所假定的循环反应的途径相符合,而且和柠檬酸的形成及转化成  $\alpha$ -酮戊二酸的不对称反应也相符合。

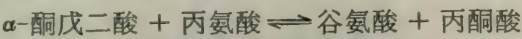
当有一分子乙酸进入循环时,循环的一个轮迴里所放出的两分子二氧化碳并非与以



乙酸引进的那两个碳相同,实际上后者仍保留在四碳二羧酸里。(图 17-2)

### 环的无定向性质: 回补反应

我们从第十四章回顾三羧酸循环是一个无定向的代谢途径,它不仅在分解代谢里起作用,也在合成代谢途径中制造前身物。环的某些中间产物,特别是  $\alpha$ -酮戊二酸和草酰乙酸,可作氨基酸的前身物,它们是通过酶促转氨反应而转化的。

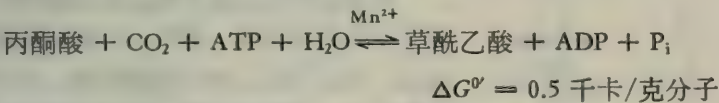


从环中也能移去柠檬酸以作脂肪酸生物合成中线粒体内乙酰 CoA 的前身物,这要通过 ATP-柠檬酸裂解酶反应:



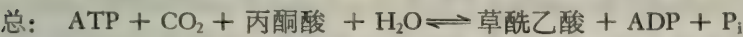
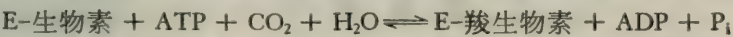
此外,还可以为血红素生物合成从环中移去琥珀酰 CoA。可见为了生物合成反应三羧酸循环可耗尽它的中间产物。

三羧酸循环中间产物能通过特殊酶促的反应,即所谓回补反应,轮流得到补充。最重要的是 H. G. Wood 和 C. Werkman 首先在细菌中发现的丙酮酸的酶促羧基化以生成草酰乙酸。经证明在动物组织内这个羧基化途径与所涉及的酶的鉴定是非常困难的问题,需要多年的研究才能弄清楚。最后 M. F. Utter 和他的同事证明肝中从丙酮酸生成草酰乙酸是由一种线粒体酶,丙酮酸羧化酶所催化:



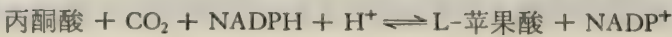
在肝和其它动物组织里每当三羧酸循环缺少草酰乙酸或其前身物时,丙酮酸可羧基化产生出更多的草酰乙酸。相反地,当草酰乙酸太多时,通过此反应的逆向可以消除它,然后如此生成的丙酮酸通过循环能完全氧化。

丙酮酸羧化酶的分子量约为 650,000,它在 0℃ 时离解成四个亚基而失去活性。天然的酶含有四个分子生物素,它们通过与活性点上特异赖氨酸残基的  $\epsilon$ -氨基生成酰胺键而与四个亚基成共价连接。每个亚基也结合一个  $\text{Mn}^{2+}$  离子。生物素辅基在酶活性点上起了羧基中间载体作用,将羧基转移到丙酮酸以生成草酰乙酸。此反应分两步进行:



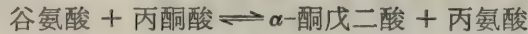
丙酮酸羧化酶是一种变构酶。除非有它的正调节剂乙酰 CoA 存在,否则导致草酰乙酸生成的向前的反应速度将是微不足道的。因此每当三羧酸循环的燃料乙酰 CoA 堆积时,它就刺激了丙酮酸羧化酶反应产生更多草酰乙酸,故能促进循环氧化更多乙酰 CoA。

虽然在高等动物肝与肾内丙酮酸羧化反应是最重要的回补反应,但其它反应可能也参与。这种反应之一就是由苹果酸酶催化的,此酶的正式名称为苹果酸脱氢酶(脱羧; NADP):



$$\Delta G^{\circ} = -36 \text{ 千卡/克分子}$$

三羧酸循环的中间产物也可从天冬氨酸和谷氨酸产生，它们通过转氨酶反应可分别转变成草酰乙酸与  $\alpha$ -酮戊二酸：



在植物和许多微生物中乙醛酸环(见下)也是补充三羧酸循环中间产物的一种重要手段。

## 三羧酸循环的调节

我们扼要地总结通过循环的丙酮酸氧化中的主要调节反应(图 17-23)。丙酮酸脱氢酶复合体是向循环提供乙酰 CoA 的主要部分的酶，其活性由于组分磷酸化(依赖 ATP)而下降，而且这磷酸化了的酶又由于脱磷酸化而得到激活。在绝大多数组织中三羧酸循环的最重要控制点是乙酰CoA与草酰乙酸缩合产生柠檬酸。然而至少在某些组织中，循环中其它反应是处在变构调节下的。其中的第一个就是与 NAD 相连的异柠檬酸脱氢酶反应，它需要 ADP 作为正的或是激发性的变构调节剂。在某些组织，如昆虫飞翔肌中， $\text{Ca}^{2+}$  也起这一反应的正调节剂作用。

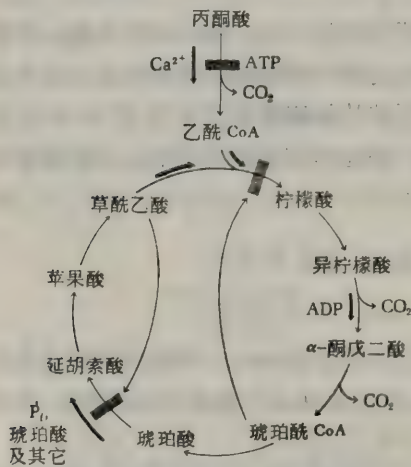


图 17-23 通过三羧酸循环调节丙酮酸氧化作用

其它似乎受到调节的反应是琥珀酸脱氢酶，它受高浓度琥珀酸、磷酸、ATP 和还原型泛醌的促进，而受草酰乙酸的强烈抑制。这个反应虽然不是环中一般限速步骤，但它在提供电子到电子传递链上时与连接 NAD 的反应竞争，因而它可能影响环的脱氢反应的整合。

三羧酸循环也受它的各种中间产物浓度的调节。因为某些环反应也在生物合成中起作用，所以三羧酸循环的速度受到一个复杂的控制网的调节。

## 乙醛酸循环

乙醛酸循环是三羧酸循环的一种修改了的形式，它在大多数植物和微生物中而不在高等动物中进行。首先由 Krebs 与 H. R. Kornberg 描述的乙醛酸循环的首要用途是，使植物和微生物能以乙酰 CoA 的形式利用脂酸或乙酸作为碳的唯一来源，特别是为了从脂酸净生物合成糖。由于三羧酸循环里从乙酰 CoA 到草酰乙酸的反应中以  $\text{CO}_2$  的形式丧失两个碳原子，故动物不能从乙酸或脂酸引起葡萄糖的净生物合成。乙醛酸循环从三羧酸循环放出  $\text{CO}_2$  的步骤处开了条旁路。图 17-24 展示乙醛酸循环的总图。乙酰 CoA 首先与草酰乙酸缩合以形成柠檬酸，然后它通过乌头酸酶的作用转化成异柠檬酸，正如三羧酸循环中那样，然而异柠檬酸降解的途径却绕过了三羧酸循环的三个反应。异柠檬酸



首先被异柠檬酸裂解酶切断以形成琥珀酸和乙醛酸(图 17-25)。然后苹果酸合成酶(图 17-26)催化乙醛酸与另一分子乙酰 CoA 缩合成苹果酸(图 17-26)。苹果酸然后由苹果酸脱氢酶氧化成草酰乙酸。草酰乙酸又可以与乙酰 CoA 缩合而开始乙醛酸循环的另一个轮回。循环的每一个轮回里,两个乙酰辅酶 A 分子进去,一个琥珀酸分子生成。琥珀酸

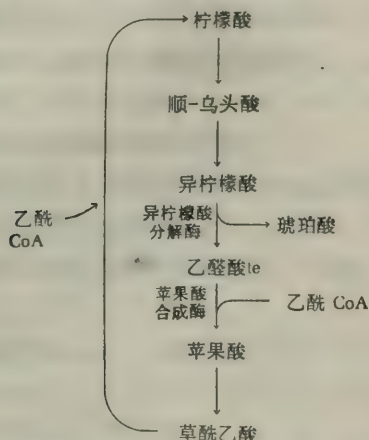


图 17-24 乙醛酸循环。除了由异柠檬酸分解酶与苹果酸合成酶所催化的反应外;其它的是三羧酸循环反应。

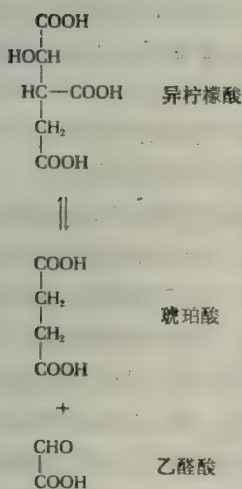


图 17-25 异柠檬酸分解酶反应

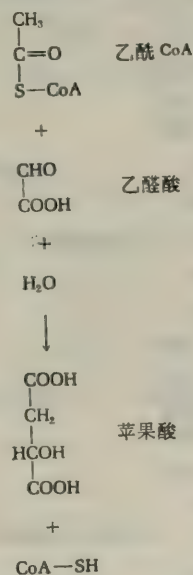
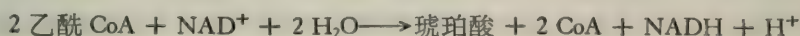


图 17-26 苹果酸合成酶反应

用于生物合成,特别是作为葡萄糖异生作用(生物合成“新”糖)的前身物,乙醛酸循环的总方程式为



三羧酸循环和乙醛酸循环在高等植物与微生物中都可能同时进行,前者通过氧化磷酸化提供需要的能量,后者则为从脂肪合成新糖提供琥珀酸。

虽然高等植物中三羧酸循环反应位于线粒体内,但乙醛酸循环的两种有特色的酶,异柠檬酸裂解酶与苹果酸合成酶却位于另一类胞质细胞器——乙醛酸循环体中。这些膜包

着的细胞器缺乏三羧酸循环的大多数酶，也没有细胞色素体系。它们仅存在于能转化脂肪酸为糖的植物细胞里。因为它们也富于过氧化氢酶。乙醛酸循环体可能与微体或过氧化物体有关或从它们衍生出来。

乙醛酸循环是受变构调节的。异柠檬酸裂解酶受到在葡萄糖由非糖前身物生物合成中的一个关键的中间产物——磷酸烯醇式丙酮酸——的强烈抑制。异柠檬酸裂解酶和苹果酸合成酶都是可诱导的酶；只当需要的时候植物细胞才合成它们。

植物种子中乙醛酸循环特别突出，它能够通过琥珀酸把从脂肪氧化衍生的乙酰残基转变成糖。高等动物缺少异柠檬酸裂解酶和苹果酸合成酶，所以不能把乙酰 CoA 转化成新糖，然而乙酰基上标记的碳原子将在葡萄糖残基上出现。

### 磷酸葡萄糖酸通路

许多细胞还有另一葡萄糖降解途径，其第一步为 6-磷酸葡萄糖的酶促脱氢作用生成 6-磷酸葡萄糖酸。磷酸葡萄糖酸通路也称为磷酸戊糖通路、或磷酸己糖支路，并非动物组织里从葡萄糖的氧化获得能量的主要途径，而是根据机体及其代谢状态专门实现四种主要活动的一种多功能途径。在大多数细胞中它的主要用途是在线粒体外胞质里产生 NADPH 形式的还原力。这种功能在肝、乳腺和肾上腺皮质等组织里特别突出，它们活跃地实现从乙酰 CoA 到脂肪酸和类固醇的还原性合成。骨骼肌在合成脂肪酸上并无活性，基本上缺少这个途径。磷酸葡萄糖酸通路的第二个特殊功能是变己糖为戊糖，特别是核酸合成中需要的 5-磷酸-D-核糖。第三功能是把戊糖变成己糖，己糖再进入酵解顺序完全氧化降解。第四功能将在第二十三章讨论，改造过的磷酸葡萄糖酸通路可以参加光合作用的暗反应中从 CO<sub>2</sub> 生成葡萄糖的过程。

磷酸葡萄糖酸通路的反应是在动物细胞线粒体外胞质的可溶部分中进行的。这一顺序中需要的所有酶类都已高度纯化并广泛地研究过，特别是由 B. L. Horecker 与 E. Racker 及其同事的工作。磷酸葡萄糖酸通路的第一个反应是由 6-磷酸葡萄糖酶促脱氢成为 6-磷酸葡萄糖酸(图 17-27)：

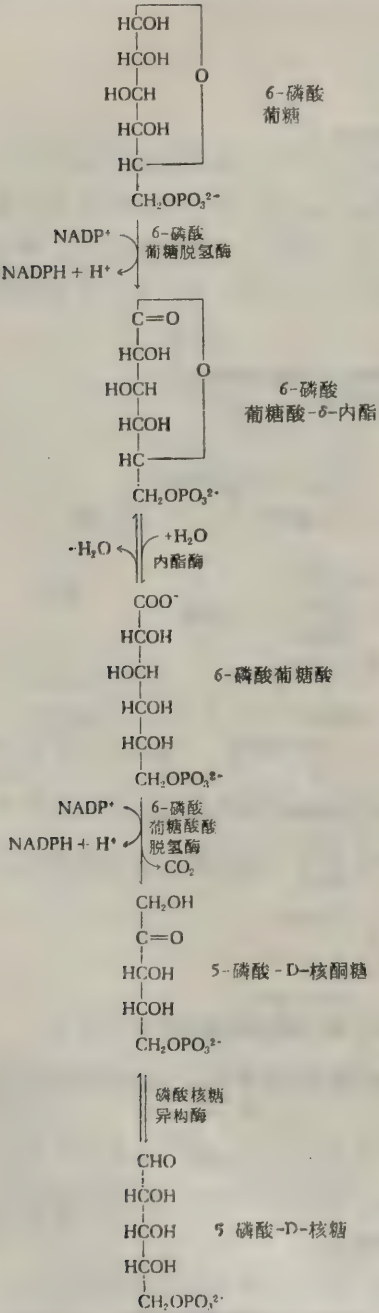
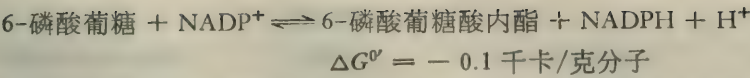
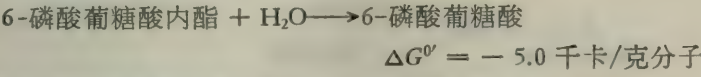


图 17-27 磷酸葡萄糖酸通路的早期步骤



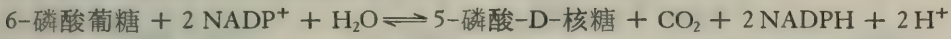


此酶由 O. Warburg 所发现,是第一个被发现对  $\text{NADP}^+$  作为电子受体有特异性的脱氢酶。它实现了吡喃型 6-磷酸葡萄糖碳原子 1 的脱氢以生成相应的 6-磷酸葡萄糖酸  $\delta$  内酯,后者又被一种特异的内酯酶水解(图 17-27):



这两个反应的总平衡极大地倾向于  $\text{NADPH}$  生成的方向。

6-磷酸葡萄糖酸在下一步中受到 6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶的氧化与脱羧作用生成 5-磷酸核酮糖(图 17-27), 此酶需要有  $\text{Mg}^{2+}$ , 这个反应产生了第二  $\text{NADPH}$  分子。然后通过磷酸核糖异构酶的作用 5-磷酸-D-核酮糖可逆地转变为 5-磷酸-D-核糖。在某些代谢条件下磷酸葡萄糖酸通路就此完结,其总平衡式可写成:



净结果即在胞汁中为还原性生物合成反应生产  $\text{NADPH}$ , 以及为核苷酸合成生产 5-磷酸-D-核糖作为前身物。

在另一些情况下由于 5-磷酸戊糖凭借三种附加酶,即磷酸戊酮糖 3-差向酶、转酮醇酶和转醛醇酶,有可能进行其它转化,使磷酸葡萄糖酸通路可进一步继续进行。磷酸核酮糖 3-差向酶催化 5-磷酸-D-核酮糖在碳原子 3 上差向化为 5-磷酸-D-木酮糖(图 17-28)。转酮醇酶含有牢固结合的硫胺素焦磷酸酯和  $\text{Mg}^{2+}$ , 能从 5-磷酸-D-木酮糖转移一个羟乙醛

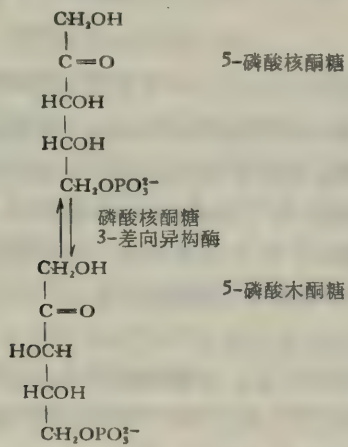
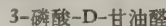


图 17-28 5-磷酸-D-核酮糖的差向异构作用

基到 5-磷酸-D-核糖而产生一个磷酸七碳糖——7-磷酸-D-景天庚酮糖和一个酵解中间产物——3-磷酸-D-甘油醛(图 17-29)。在这一反应中羟乙醛基 ( $\text{CH}_2\text{OH}-\text{CO}-$ ) 首先从 5-磷酸-D-木酮糖转移到与酶结合的硫胺素焦磷酸酯以形成后者的  $\alpha$ ,  $\beta$ -二羟乙基衍生物, 此物和早先叙述过的丙酮酸脱氢酶作用过程中产生的硫胺素焦磷酸酯的  $\alpha$ -羟乙基衍生物相似。硫胺素焦磷酸酯作为羟乙醛基的中间受体, 将它转移到受体分子 5-磷酸-D-核糖。转酮醇酶也能催化从许多其它磷酸-2-酮糖转移羟乙醛基到许多不同磷酸醛糖中任何一种的 1 碳原子上。在这种转变过程中不出现游离羟乙醛。



4-磷酸-D-赤藓糖

图 17-30 转醛醇酶反应

$$\text{5-磷酸木酮糖} + \text{磷酸} \rightleftharpoons \text{3-磷酸甘油醛} + \text{乙酰磷酸} + \text{H}_2\text{O}$$



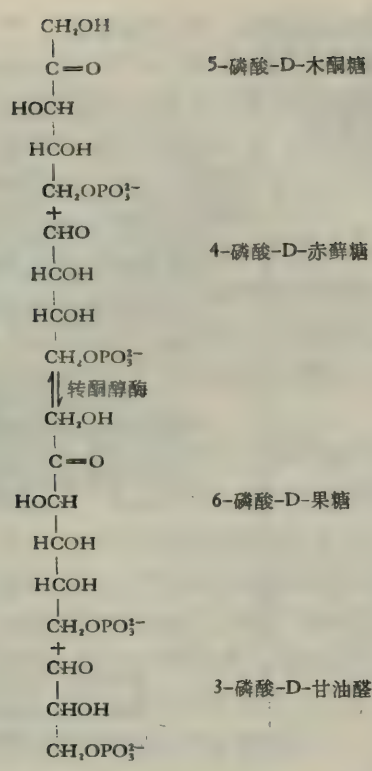
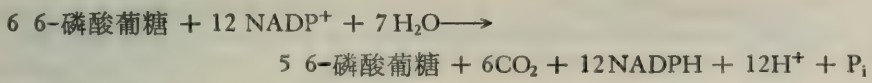


图 17-31 转酮醇酶所催化的另一反应

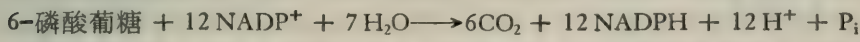
然后 3-磷酸甘油醛变成乳酸，而乙酰磷酸则成乙酸。

如是通过磷酸葡萄糖酸通路酶类的独立作用,或与酵解顺序酶类的协力作用,磷酸单糖可以发生各种非氧化的与氧化的反应。因此磷酸葡萄糖酸通路不是明确规定的只产生单一终末产物的途径,而是一套具有极大代谢适应性的非常分歧的途径。

磷酸葡萄糖酸通路也能实现 6-磷酸葡萄糖的完全氧化成 CO<sub>2</sub>, 同时 NADP<sup>+</sup> 还原成 NADPH。这是在一个复杂反应序列中(图 17-32) 六分子 6-磷酸葡萄糖氧化成 5-磷酸核酮糖和 CO 各六分子,然后又从六分子 5-磷酸核酮糖再生出五分子 6-磷酸葡萄糖。总方程式为:



约去相同项则得



6-磷酸葡萄糖进入磷酸葡萄糖酸通路反应以后的流动方向和所选择的途径主要取决于细胞对 NADPH 和 5-磷酸核糖的相对需要量。若对 NADPH 的需要量超过了对 5-磷酸核糖的,则过多的磷酸戊糖可以往回变成磷酸己糖。若是 5-磷酸核糖的需要量占优势,则通过转酮醇酶和转醛醇酶反应将从 6-磷酸果糖流向产生磷酸戊糖。仅在有如脂类生物合成活跃的微生物或分泌乳汁的乳腺那样一定的细胞和组织里,才会有专门引向NADPH的完全氧化的代谢途径。(图 17-32)

有一种同位素方法可用以估计一定细胞或组织里葡萄糖分解代谢经由酵解途径对磷

酸葡萄糖通路的分数。将细胞分成两批,一批与葡萄糖-1- $^{14}\text{C}$  一道保温,另一批则与葡萄糖-6- $^{14}\text{C}$  保温。然后对葡萄糖氧化生成的  $\text{CO}_2$  中  $^{14}\text{C}$  出现的初速作出比较。酵解顺序与三羧酸循环的联合作用从两类标记的葡萄糖中以相等的初速产生 $^{14}\text{CO}_2$ ,而磷酸葡萄糖通路开始只从葡萄糖-1- $^{14}\text{C}$  产生 $^{14}\text{CO}_2$ 。这种试验已经在许多组织上做过。大鼠肝中从磷酸葡萄糖通路来的 $^{14}\text{CO}_2$  取决于代谢状态,可高达 20%。在乳腺中,需要  $\text{NADPH}$  的脂肪酸

合成是一种主要代谢活动,故进入磷酸葡萄糖通路的葡萄糖部分大多了。然而在心肌和骨骼肌里较少葡萄糖通过磷酸葡萄糖通路而氧化。

在第二十三章里叙述了葡萄糖醛酸-抗坏血酸途径,它是葡萄糖降解的一种虽是次要的却是有意义的途径。

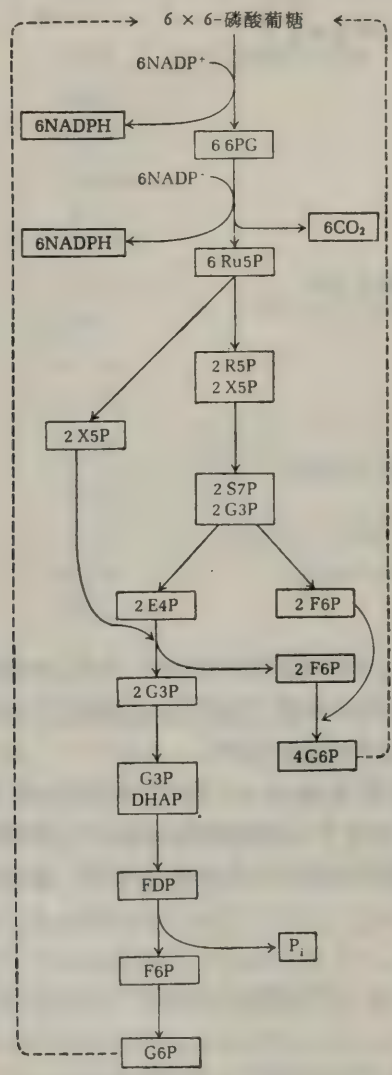


图 17-32 一克分子 6-磷酸葡萄糖(G6P) 通过磷酸葡萄糖通路完全氧化成  $\text{CO}_2$  与相当量  $\text{NADP}^+$  的还原简图。书中写出全部平衡方程式。

注解:

- 6PG = 6-磷酸葡萄糖
- Ru5P = 5-磷酸核酮糖
- R5P = 5-磷酸核糖
- X5P = 5-磷酸木酮糖
- S7P = 7-磷酸景天庚酮糖
- G3P = 3-磷酸甘油醛
- G6P = 6-磷酸葡萄糖
- E4P = 4-磷酸赤藓糖
- DHAP = 磷酸二羟丙酮
- FDP = 1, 6-二磷酸果糖
- F6P = 6-磷酸果糖

## 摘 要

呼吸作用分三段进行:从丙酮酸、脂肪酸和氨基酸的氧化生成乙酰 CoA (I 段);乙酰 CoA 的乙酰基通过三羧酸循环降解成  $\text{CO}_2$  和氢原子 (II 段);与这些氢原子相当的电子转移到分子氧 (III 段),这过程是与 ADP 偶联的磷酸化同时进行的。经过丙酮酸氧化产生于糖乙酰 CoA。线粒体内进行的三羧酸循环从柠檬酸合成酶催化乙酰 CoA 与草酰



乙酸缩合生成柠檬酸开始。乌头酸酶然后催化可逆性的从柠檬酸形成异柠檬酸的反应,在这个反应中一个前手性分子柠檬酸受到不对称的作用。与 NAD 相连的异柠檬酸脱氢酶是由 ADP 激活的一种变构酶,异柠檬酸然后受此酶氧化成  $\alpha$ -酮戊二酸和  $\text{CO}_2$ 。 $\alpha$ -酮戊二酸在与丙酮酸氧化成乙酰 CoA 相似的一序列反应中氧化成为琥珀酰 CoA。琥珀酰 CoA 与 GDP 和磷酸根作用生成游离琥珀酸和 GTP; GTP 的末端磷酸根又转移到 ADP。琥珀酸又由琥珀酸脱氢酶氧化成延胡索酸,此酶是一种黄素酶。延胡索酸由延胡索酸酶加水成 L-苹果酸,它又被与 NAD 连接的苹果酸脱氢酶氧化再生成一分子草酰乙酸。后者又与另一分子乙酰 CoA 结合开始环的另一个轮迴。用碳标记中间产物所做的同位素追踪试验已经确定在完整细胞里三羧酸循环是糖和其它燃料氧化降解的主要机制。循环的总速度是由柠檬酸合酶反应控制的。

三羧酸循环的中间产物也用作生物合成的前身物。然后由回补反应补充循环的中间产物,最重要的回补反应是消耗 ATP 生成草酰乙酸的丙酮酸的可逆羧基化作用。在能用乙酸为唯一碳源而生活的机体中,一个柠檬酸循环的变种,即乙醛酸循环发生作用。它使得为从脂肪酸生物合成葡萄糖而要由乙酸生成琥珀酸成为可能。

6-磷酸葡萄糖也可以通过磷酸葡萄糖酸通路而分解,生成脂肪酸与类固醇的还原性生物合成所需的 NADPH,生成核酸生物合成所需的 5-磷酸核糖,以及使得某些植物中有可能从  $\text{CO}_2$  光合生成葡萄糖。这一通路也使得各种三、四、五、六和七碳糖类有可能互相转变,以及将所有这些糖类在代谢上与酵解顺序连接起来。

## 参 考 文 献

### 书籍

- Alworth, W. L.: *Stereochemistry and Its Application to Biochemistry*, Wiley-Interscience, New York, 1972. Examines the stereochemistry of many enzymatic reactions, including those of the citric acid cycle.
- Boyer, P. D.: *The Enzymes*, 3d ed., Academic, New York, 1971. particularly vol. 5, which contains reviews of aconitase, fumarase, and enolase; vol. 6, which has extensive reviews on oxaloacetate formation; and vol. 7, with reviews on aldolases and transaldolases.
- Goodwin, T. W. (ed.): *The Metabolic Roles of Citrate*, Academic, New York, 1968. A Biochemical Society Symposium in honor of Sir Hans Krebs. An important collection of informative articles.
- Krebs, H. A., and H. L. Kornberg: *Energy Transformations in Living Matter*, Springer-Verlag, Berlin, 1957.
- Lowenstein, J. M. (ed.): *The Citric Acid Cycle*, vol. 13 of *Methods in Enzymology*, Academic, New York, 1969. Comprehensive collection of authoritative articles on experimental methods.
- Lowenstein, J. M. (ed.): *Citric Acid Cycle: Control and Compartmentation*, Dekker, New York, 1969. Another collection of valuable articles.
- Mehlman, M. A., and R. W. Hanson (ed.): *Energy Metabolism and the Regulation of Metabolic Processes in Mitochondria*, Academic, New York, 1972. Articles on the regulation of the tricarboxylic acid cycle.
- Wood, W. B., J. H. Wilson, R. M. Benbow, and L. E. Hood: *Biochemistry: A Problems Approach*, Benjamin. Menlo Park, Calif., 1974. Chapters 9 and 10 constitute a study guide with problems.

### 论文

- Axelrod, B.: "Other Pathways of Carbohydrate Metabolism," pp. 272—308 in D. M. Greenberg (ed.). *Metabolic Pathways*, 3d ed., vol. 1, Academic, New York, 1967. The phosphogluconate and other pathways.
- Barrera, C. R., G. Namihira, L. Hamilton, P. Munk, M. H. Eley, T. C. Linn, and L. J. Reed: " $\alpha$ -Keto Acid Dehydrogenases; XVI: Studies on the Subunit Structure of the Pyruvate Dehydrogenase Complexes from Bovine Kidney and Heart," *Arch. Biochem. Biophys.*, 148: 343—358 (1972).
- Davis, K. A., and Y. Hatefi: "Succinate Dehydrogenase; I: Purification, Molecular Properties, and

- Substructure," *Biochemistry*, 10: 2509—2516 (1971).
- Denton, R. M., P. J. Randle, and B. R. Martin: "Stimulation by  $\text{Ca}^{2+}$  of Pyruvate Dehydrogenase Phosphate Phosphatase," *Biochem. J.*, 128: 161—163 (1972).
- Glusker, J. P.: "Mechanism of Aconitase Action Deduced from Crystallographic Studies of Its Substrates," *J. Mol. Biol.*, 38: 149—162 (1968).
- Hanstein, W. G., K. H. Davis, M. A. Ghalambor, and Y. Hatefi: "Succinate Dehydrogenase; II: Enzymatic Properties," *Biochemistry*, 10: 2517—2524 (1971).
- Krebs, H. A.: "The History of the Tricarboxylic Acid Cycle," *Perspect. Biol. Med.*, 14: 154—170 (1970). A personal account of the experimental basis and origin of the cycle.
- Lai, C. Y., and B. L. Horecker: "Aldolase: A Model for Enzyme Structure-Function Relationships," *Essays Biochem.*, 8: 149—178 (1972).
- La Noue, K. F., J. Bryla, and J. R. Williamson: "Feedback Interactions in the Control of Citric Acid Cycle Activity in Rat Heart Mitochondria," *J. Biol. Chem.*, 247: 667—679 (1972).
- Linn, T. C., J. W. Pelley, F. H. Pettit, F. Hucho, D. D. Randall, and L. J. Reed: "Purification and Properties of the Component Enzymes of the Pyruvate Dehydrogenase Complexes from Bovine Kidney and Heart," *Arch. Biochem. Biophys.*, 148: 327—342 (1972).
- Lowenstein, J. M.: "The Tricarboxylic Acid Cycle," pp. 146—270 in D. M. Greenberg (ed.), *Metabolic Pathways*, 3d ed., vol. 1, Academic, New York, 1967. An excellent review, including stereochemical relationships.
- Moss, J., and M. D. Lane: "The Biotin-Dependent Enzymes," *Adv. Enzymol.*, 35: 321—442 (1971).
- Nishimura, J., and F. Grinnell: "Mechanism of Action and Other Properties of Succinyl Coenzyme A Synthetase," *Adv. Enzymol.*, 36: 183—202 (1972).
- Plaut, G. W. E.: "DPN-Linked Isocitrate Dehydrogenase of Animal Tissues," *Curr. Top. Cell Regul.*, 2: 1—27 (1970).
- Singer, T. P., E. B. Kearney, and W. C. Kenney: "Succinate Dehydrogenase," *Adv. Enzymol.*, 37: 189—272 (1973).
- Vogel, O., B. Hoehn, and U. Henning: "Subunit Structure of the Pyruvate Dehydrogenase Complex," *Eur. J. Biochem.*, 30: 354—360 (1972).
- Walker, W. H., T. P. Singer, S. Ghisla, and P. Hemmerick: "Studies on Succinate Dehydrogenase: 8- $\alpha$ -Histidyl-FAD as the Active Center" *Eur. J. Biochem.*, 26: 279—289 (1972).

## 习 题

- 解释下列每种化合物氧化成  $\text{CO}_2$  和  $\text{H}_2\text{O}$  涉及三羧酸循环多少转: (a) 葡萄糖, (b) 甘油醛, (c) 柠檬酸, (d) 琥珀酸?
- 假设向每一种下列呼吸细胞制剂加入用  $^{14}\text{C}$  标记了甲基的乙酸: (a) 肝细胞, (b) 加了丙二酸的肝细胞, (c) 豆芽。随后又从每一种制剂中分离出琥珀酸。推测琥珀酸的哪一个碳上是标记了的?
- 将用丙二酸毒害呼吸的肌悬浮液与用同位素标记过的底物一起保温, 分离出下列三羧酸循环中间产物。试推测每种情况下分离出的产物的哪个碳原子是标记了的。
  - 底物为:  $^{14}\text{CH}_3\text{COCOOH}$  和过量未标记的草酰乙酸。列出的产物为: (1) 异柠檬酸, (2)  $\alpha$ -酮戊二酸, (3) 琥珀酸;
  - 底物为:  $^{14}\text{CH}_3\text{COCOOH}$ 。产物为: (1) 异柠檬酸, (2)  $\alpha$ -酮戊二酸, (3) 琥珀酸;
  - 底物为:  $\text{H}^{14}\text{CO}_3^-$ 。产物为: (1) 异柠檬酸, (2)  $\alpha$ -酮戊二酸, (3) 琥珀酸, (4) 苹果酸;
  - 底物为: 5- $^{14}\text{C}$ -果糖; 产物为: (1) 异柠檬酸, (2) 琥珀酸。
- 把在碳原子 2 上用同位素标记过的丙酮酸输进肝的三羧酸循环中。假定所有标记过的丙酮酸立刻通过乙酰 CoA 转化为柠檬酸, 试测定在循环的 (a) 第一转中, (b) 第二转中, (c) 第三转中, 以  $^{14}\text{CO}_2$  形式各损失初始放射活性的分部。
- 假定在第 4 题条件下, 却标记了碳原子 3 ( $^{14}\text{CH}_3\text{COCOO}^-$ ), 测定如下过程 (a) 循环的第一转, (b) 第二转, (c) 第三转, (d) 第四转, (e) 第五转中以  $^{14}\text{CO}_2$  形式损失原始放射活性的分部。
- 先向大鼠肝内糜悬液中加丙二酸完全抑制琥珀酸脱氢酶, 再加下列底物。假定糖原供应充足, 写出它们变成琥珀酸的平衡方程式。 (a) 柠檬酸, (b) 丙酮酸, 与 (c) 延胡索酸。



7. 在胞汁中只产生微不足道的丙酮酸的条件下重复第6题。

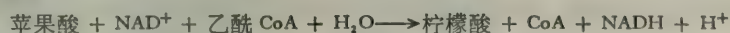
8. 写出肝中通过涉及利用吡啶核苷酸的代谢途径转变  $3\text{-}^{14}\text{C}$  葡萄糖成 5-磷酸-D 核糖的平衡方程式。预测产物的哪个(几个)碳原子会被标记?

9. 写出通过不涉及吡啶核苷酸参加的代谢途径转变 6-磷酸葡萄糖为 5-磷酸核糖的平衡方程式。

10. 写出通过不需要磷酸果糖激酶作为必需酶的代谢途径转变 D-葡萄糖为丙酮酸的平衡方程式。

11. 写出肝中转变 5-磷酸核糖为乳酸的平衡方程式。若用  $^{14}\text{C}$  标记 5-磷酸核糖碳原子 1, 乳酸的哪个(几个)碳原子将被标记?

12. 根据方程式



将苹果酸换为柠檬酸, 从书中数据试计算其平衡常数和标准自由能变化。

13. 在某种条件下苹果酸的线粒体内浓度为  $0.22\text{ mM}$ 、而  $\text{NAD}/\text{NADH}$  比率为 20。试计算这些条件下线粒体内草酰乙酸的最大浓度(假定浓度为  $25^\circ\text{C}$ )。

[任邦哲译]

## 第十八章 氧化还原酶类和电子传递

本章将讨论来自三羧酸循环中间产物及其它底物的电子对如何流经呼吸链,传到呼吸的最后电子受体——分子氧。这一过程称为电子传递。因为它释放大量的自由能,所以是细胞活动的主要能源。而大部分自由能在叫做氧化磷酸化作用的过程中以 ATP 的磷酸键能形式贮存起来(见图 17-1)。

氧化还原酶,特别是那些参与电子传递的氧化还原酶,其结构和作用机制一般均较复杂,并且比其它酶类了解得少。大多数电子传递链包埋在线粒体内膜,很难以可溶形式提出和纯制。另外,我们尚未充分理解,当电子传递时释出的自由能如何在氧化磷酸化过程中贮存起来和转变成磷酸键能。因此,电子传递和氧化磷酸化仍然是生物化学研究的令人注目的领域。

本章将首先考虑氧化还原酶的主要类别,再讨论在需氧细胞内它们怎样参加电子传递的主要途径。我们还将简要地检查为不同目的所特有的其它类型氧化反应的性质。在下一章中,我们将了解通过电子传递而转移的能量如何被用来在氧化磷酸化过程中生成 ATP。

### 氧化-还原反应

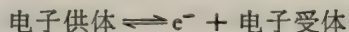
虽然一些酶促氧化还原反应已经在前面阐述过,但现将以较系统的方式进行处理,以期能够对比它们的作用机制、平衡和能量关系。氧化还原反应,是指有电子从一个电子供体(还原物或还原剂)转移到一个电子受体(氧化物或氧化剂)上的那些反应。在有些氧化还原反应中,一个或多个电子的传递是通过氢原子的传递而实现的,因此,脱氢就相当于氧化反应。通常采用还原当量或电子当量这一名称来说明参与氧化还原反应的电子和(或)氢原子。

正如 Brönsted 酸和碱可作为共轭的酸-碱对起作用那样,氧化剂和还原剂也可作为共轭的氧化还原对或氧化还原偶起作用。

酸碱反应:



氧化-还原反应:



正如不同的酸在解离质子的趋势方面不一样,不同还原剂丢失电子的趋势也有差异。还原剂丢失电子(或氧化剂获得电子)的这种趋势,可用标准氧还电位表示。它的意义是:当 1 个半电池中所含还原剂和氧化剂的浓度均为 1.0 M 时,在 25℃ 及 pH 7.0 使其与一个能可逆地从一些还原剂接受电子的电极达到平衡(图 18-1)。这个半电池所产生的电动势(emf)的伏特数,即称为标准氧还电位。按照常规,电极方程式可写成:



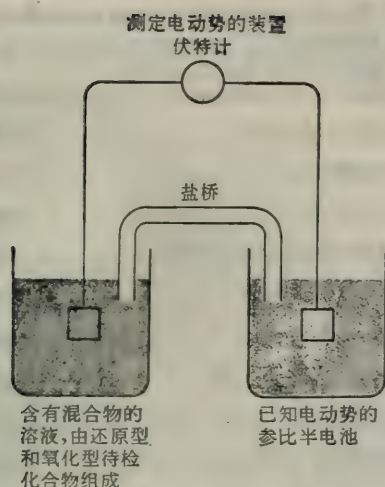
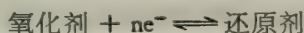
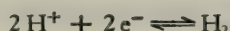


图 18-1 氧还电位的测定。将含有混合的氧化型和还原型待检化合物的溶液放入左侧容器内;它们与惰性电极平衡。盐桥含有饱和的 KCl 液,与电位已知的一个参比电池有电路相联。从观察到的总电动势和参比电池的已知电动势,可以测出含有氧化剂和还原剂混合液的左侧电池的电动势。当氧化剂和还原剂的浓度相等时,左侧电池的电位即为标准或中点氧-还电位。



此处  $n$  是所传递的电子数目。同样,下列氢电极反应的标准氧还电位,也可按惯例用作参比电位:



当氢气的压力为 1.0 个大气压,  $[\text{H}^+]$  等于 1.0 M (即  $\text{pH} = 0.0$ ) 和温度为  $25^\circ\text{C}$  时,该反应的电位定为 0.0 伏特。若将此数值校正到  $\text{pH} 7.0$  ( $[\text{H}^+] = 1 \times 10^{-7}\text{M}$ ),亦即在所有生化计算中规定的对照  $\text{pH}$  值,氢电极的标准氧还电位则变成  $-0.42$  伏。

生物学上一些重要的氧还对的标准氧化还原电位(也称为标准氧还电位),已载入表 18-1 中。在显示较  $2\text{H}^+ - \text{H}_2$  更负的标准电位的氧还对中,其还原剂丢失电子的倾向较分子氢为大;反之,那些显示较正电位的氧还对,其还原剂丢失电子的倾向较氢为小。注意氧-水对具有 0.82 伏特的强正电位。所以分子氧对于电子有很高的亲和力,是一种很好的氧化剂。相反,水丢失电子的倾向很小,所以它是很弱的还原剂。

正如 Henderson-Hasselbalch 方程式表示了酸的离解常数、它的  $\text{pH}$  以及其质子供体和受体的浓度之间的定量关系一样,一个形式上类似的关系——Nernst 方程式,则表示一个已知的氧还对的标准氧还电位、它的观测电位,以及其电子供体和受体的浓度比率之间的关系。Nernst 方程式是:

$$E_h = E'_0 + \frac{2.303 RT}{n \mathcal{F}} \log \frac{[\text{电子受体}]}{[\text{电子供体}]} \quad (1)$$

上式中  $E'_0$  表示标准氧还电位 ( $\text{pH} = 7.0$ , 温度  $= 25^\circ\text{C}$  或  $298\text{K}$ , 所有浓度均为 1.0 M),  $E_h$  为观测的电极电位,  $R$  为气体常数 ( $8.31$  焦耳/度/克分子),  $T$  为绝对温度 (开氏),  $n$  为被传递的电子数目;  $\mathcal{F}$  为法拉第常数 [ $23.062$  卡/伏特  $= 96.406$  焦耳/伏特]。在  $25^\circ\text{C}$  ( $298\text{K}$ ), 当  $n = 1$  时,  $2.303 RT/n \mathcal{F}$  值为  $0.059$ ; 而当  $n = 2$  时, 其值为  $0.03$ 。因为生物氧还对的平衡通常是以两个电子的转移来计算的,所以 Nernst 方程式可简化为:

表 18-1 在 pH 接近 7.0, 温度为 25—30°C 时, 按照两个电子传递来表示的某些共轭氧还对的标准氧还电位  
细胞色素和泛醌的标准电位随着其存在状态而变动, 即它们究竟已被分离还是存在于线粒体膜中;  
此表所列数值是指后一种情况。

电极方程式	$E'_0$ (伏特)
乙酸 + $2H^+ + 2e^- \rightleftharpoons$ 乙醛	-0.58
$2H^+ + 2e^- \rightleftharpoons H_2$	-0.421
$\alpha$ -酮戊二酸 + $CO_2 + 2H^+ + 2e^- \rightleftharpoons$ 异柠檬酸	-0.38
乙酰乙酸 + $2H^+ + 2e^- \rightleftharpoons \beta$ -羟丁酸	-0.346
$NAD^+ + 2H^+ + 2e^- \rightleftharpoons NADH + H^+$	-0.320
$NADP^+ + 2H^+ + 2e^- \rightleftharpoons NADPH + H^+$	-0.324
乙醛 + $2H^+ + 2e^- \rightleftharpoons$ 乙醇	-0.197
丙酮酸 + $2H^+ + 2e^- \rightleftharpoons$ 乳酸	-0.185
草酰乙酸 + $2H^+ + 2e^- \rightleftharpoons$ 苹果酸	-0.166
延胡索酸 + $2H^+ + 2e^- \rightleftharpoons$ 琥珀酸	-0.031
泛醌 + $2H^+ + 2e^- \rightleftharpoons$ 泛醇	+0.10
2 细胞色素 $b_k$ (还原型) + $2e^- \rightleftharpoons$ 2 细胞色素 $b_k$ (氧化型)	+0.030
2 细胞色素 $c$ (还原型) + $2e^- \rightleftharpoons$ 2 细胞色素 $c$ (氧化型)	+0.254
2 细胞色素 $a_3$ (还原型) + $2e^- \rightleftharpoons$ 2 细胞色素 $a_3$ (氧化型)	+0.385
$1/2 O_2 + 2H^+ + 2e^- \rightleftharpoons H_2O$	+0.816

$$E_h = E'_0 + 0.03 \log \frac{[\text{电子受体}]}{[\text{电子供体}]} \quad (2)$$

Nernst 方程式, 在数学上表示用一种强氧化剂与一已知电子供体反应所得到的滴定曲线的形状(图 18-2)。当进行滴定时, 随着电子供体的增加部分被转变为氧化型, 引起  $[\text{电子受体}]/[\text{电子供体}]$  的比值增大, 直至达到中点, 此时  $[\text{电子受体}] = [\text{电子供体}]$ 。在该点上,  $0.03 \log [\text{电子受体}]/[\text{电子供体}]$  这一项显然等于零, 而 Nernst 方程式又可简化为:

$$E_h = E'_0$$

所以, 标准氧还电位就是在 pH 7.0, 25°C 和 1.0 个大气压下, 半电池在一已知还原剂滴定曲线的正中点处的电动势伏特数, 正如酸的  $pK'$  值等于酸碱滴定曲线中点的 pH 那样。标准氧还电位  $E'_0$  常被称为中点电位。不像酸-碱滴定那样是无需催化剂的快速离子反应, 有机化合物的氧化还原反应进行较慢, 通常需要有催化剂或酶来保证快速达到平衡。

不同的生物氧还系统的标准氧还电位, 使我们能预知在标准状况下电子将从那一氧还流向另一氧还对的方向, 正如磷酸根转移电

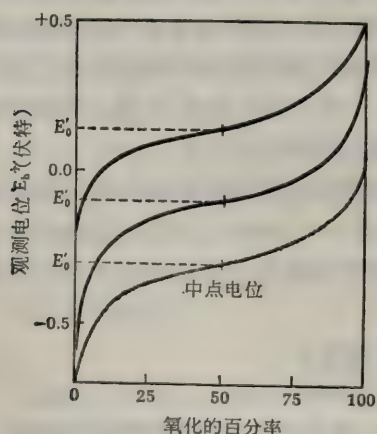
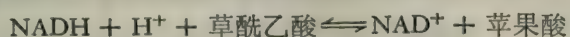


图 18-2 三种具有不同标准电位(或中点电位)的共轭氧还对的氧化-还原滴定曲线。从曲线中点向纵座标画一根垂线, 即可自垂线外推出中点电位。



位可使我们预知磷酸根将发生酶促转移的方向一样。例如,从表 18-1 的氧还电位,我们能够得出结论:当所有四种成分以其 1 M 的标准浓度存在时,  $\text{NAD}^+ - \text{NADH}$  对倾向于将电子丢失给草酰乙酸-苹果酸对,因为  $\text{NAD}^+ - \text{NADH}$  对有一较负性的电位,因此其电子“压力”比草酰乙酸-苹果酸对大些,后者对电子有较大的亲和力。所以如我们从所有成分的 1 M 浓度开始,下列反应的平衡点将移向右侧:



这里应注意,除非我们加入催化剂(如苹果酸脱氢酶),否则这一反应将不能以可测定的速度发生。虽然此反应在标准状况下有向右进行的趋势,如果我们适当调整所有成分的浓度,即如果减少反应物的浓度及(或)增加产物的浓度,也可使反应向左侧进行。确实,在线粒体内,此反应是三羧酸循环的一个步骤。在正常情况下,因为草酰乙酸被迅速移除,以致它的浓度较参加反应的其它成分都低很多,所以使此反应移向左侧。

所有四种成分在氧化还原反应中的平衡浓度,可以从相互作用系统的标准电位和所有成分的总浓度计算出来。

## 电子转移酶的种类

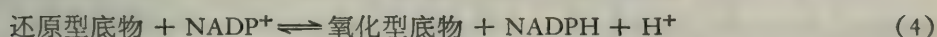
在电子从有机底物传递到分子氧的主要途径中,有四类氧化-还原酶或电子转移蛋白参加,它们是:(1)需要吡啶的脱氢酶类,它需要 NAD 或 NADP 作为辅酶;(2)需要黄素的脱氢酶类,它含有黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)或黄素单核苷酸(FMN)作为辅基;(3)含铁-硫蛋白类和(4)细胞色素类,含有铁卟啉辅基。此外,脂溶性辅酶——泛醌或辅酶 Q,也在电子转移中起作用。现在即将依次阐述这些成分。

## 需要吡啶的脱氢酶类

由于这类脱氢酶的成员需要含有尼克酰胺(一种吡啶衍生物)的 NAD 或 NADP 作为辅酶,所以在分类上将它们称为需要吡啶的脱氢酶类。已知这类酶约有 200 种或 200 种以上,能在新陈代谢的不同方面起作用,其重要例子已载入表 18-2 中。它们催化的下列总反应,决定于它们需要或选择那一种吡啶核苷酸:



或



这些反应涉及以氢化物离子( $\text{H}^-$ )的形式,从底物可逆地传递 2 个还原当量到吡啶核苷酸的尼克酰胺环(氧化型)的第四位置上;其它氢原子则以游离  $\text{H}^+$  从底物脱下。采用以氘或氚首次标记正常情况下能被脱氢酶脱下的氢的那种底物分子,已证明一个氢原子可直接从底物转移到  $\text{NAD}^+$ 。继标记底物的酶促脱氢作用之后,发现有一个标记氢原子在生成的 NADH 的吡啶环第四位上被回收,而未被水介质中的  $\text{H}^+$  稀释。

吡啶核苷酸与脱氢酶蛋白的结合是非共价性的,且较疏松。所以 NAD 和 NADP 不能视为固定的辅基,但可视为底物,因为在大多数情况下,在催化循环中它们与活性部位结合,并从活性部位解离。因此,吡啶核苷酸发挥了可解离的电子传递体的作用。

表 18-2 需要吡啶的脱氢酶系统的性质

系 统	底物对的 $E'_0$	对吡啶环第四位的立体特异性
需要 NAD 的:		
异柠檬酸	-0.38	
D- $\beta$ -羟丁酸	-0.346	
3-磷酸甘油醛	-0.29	
二氢硫辛酰	-0.29	A 或 B
L- $\beta$ -羟脂酰辅酶 A	-0.238	B
乙醇	-0.197	A
乳酸	-0.185	A
3-磷酸甘油	-0.19	B
L-苹果酸	-0.166	A
需要 NADP 的:		
异柠檬酸	-0.38	A
6-磷酸葡萄糖	-0.32	B
NAD 或 NADP:		
L-谷氨酸	-0.14	B

许多需要吡啶的脱氢酶类已制得纯晶形, 这包括 3-磷酸甘油醛脱氢酶、乳酸脱氢酶和苹果酸脱氢酶等。有些需要吡啶的脱氢酶类(如  $\beta$ -羟丁酸脱氢酶)位于线粒体内, 有些如乳酸脱氢酶含在胞汁中, 而还有一些酶(如苹果酸脱氢酶)则在两种隔室都有。在动物细胞内, NAD 通常以较 NADP 为多的数量存在。在肝内有 60% 的总 NAD 存在于线粒体内, 而其余的则在线粒体外的细胞质内。细胞的 NADP 含量与其生物合成的活性成正比。需要 NAD 的脱氢酶主要在呼吸中, 例如从底物转运电子到氧时起作用; 而需要 NADP 的脱氢酶, 则主要在从分解代谢的中间产物转运电子到生物合成的中间产物时起作用。游离的  $\text{NAD}^+$  和  $\text{NADP}^+$  在溶液中以两型构象出现, 即开放或伸展型与关闭或堆聚型。堆聚型的平面尼克酰胺与腺嘌呤环彼此平行。溶液中以堆聚型占优势, 但是当  $\text{NAD}^+$  与一些脱氢酶结合时, 即呈开放型。大多数需要吡啶的脱氢酶对 NAD 或 NADP 具有特异性, 但只有少数(如谷氨酸脱氢酶)与这两种辅酶都能起反应。(表 18-2)

许多需要吡啶的脱氢酶含有牢固结合的二价金属离子, 如乙醇脱氢酶含有  $\text{Zn}^{2+}$ 。

### 需要吡啶的脱氢酶类的测定

$\text{NAD}^+$  和  $\text{NADP}^+$  的酶促还原反应[方程式 (3) 和 (4)], 伴有三个对测定需要吡啶的脱氢酶类的活性有用的特殊变化。不管是氧化型或还原型, 这些辅酶都不能在可见范围内吸光, 但两者能在近 260 毫微米处的紫外区极强烈地吸光, 而这正是腺嘌呤环的最大吸收。当  $\text{NAD}^+$  和  $\text{NADP}^+$  被还原时, 在 340 毫微米即出现一个新的最大吸收(图 18-3)。340 毫微米处吸光率的增加, 反映了尼克酰胺部分的芳族吡啶环的还原。340 毫微米吸收峰的出现(或消失)可用来追踪需要吡啶的脱氢酶所催化的反应过程。

也可用测定 pH 的变化来追踪需要吡啶的氧化-还原反应, 因为  $\text{NAD}^+$  (或  $\text{NADP}^+$ ) 还原的结果是形成一个  $\text{H}^+$  离子[方程式 (3) 和 (4)]。另一种方法是测定其荧光变化。荧光法虽然非常灵敏, 但是许多因素会引起荧光骤然消失或带来干扰。

$\text{NAD}^+$  和  $\text{NADP}^+$  也能用还原剂如连二亚硫酸钠或氢硼化钠进行非酶促性还原。又



可以用高铁氰化物使 NADH 和 NADPH 发生非酶促性的再氧化,但在 pH7.0 时它们不能被分子氧直接氧化。

### 需要吡啶的脱氢酶类的立体特异性

从两种意义上来说,需要吡啶的脱氢酶可能具有立体特异性。一是它们当中许多对其底物的一种已知立体异构物是特异的,如乳酸脱氢酶对 L-乳酸有特异性;另一意义是,大多数需要吡啶的脱氢酶具有立体特异性。当以非酶学方法使 NAD<sup>+</sup> 或 NADP<sup>+</sup> 的吡啶环还原时,传递到尼克酰胺环的第 4 个碳原子上的那个氢原子,可能接近此环的任一侧,以致产生了等量的两种可能的立体特异形式(图 18-4)。然而,当吡啶环被脱氢酶进行酶促还原时,氢原子却只能立体特异地从底物传递到尼克酰胺环的一侧。表 18-2 表明,有些脱氢酶传递氢到环的 A 侧,而有些酶则传递到 B 侧。采用以氘或氚标记的底物分子,已经确证了对吡啶环的这种立体特异性。已知有一种脱氢酶对尼克酰胺环无立体特异性,即二氢硫辛酰脱氢酶。这些观察指出,底物和 NAD<sup>+</sup> 分子两者都必须在酶催化部位上具有特异的彼此对应的立体化学定向。

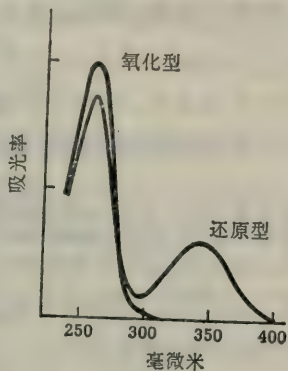


图 18-3 NAD<sup>+</sup> 和 NADH 的吸收光谱。A 是吸光率 (logI<sub>0</sub>/I)。NADH 的克分子吸光系数 (见图 12-7) 在 340 毫微米处是 6.23×10<sup>3</sup> 厘米<sup>2</sup>/克分子

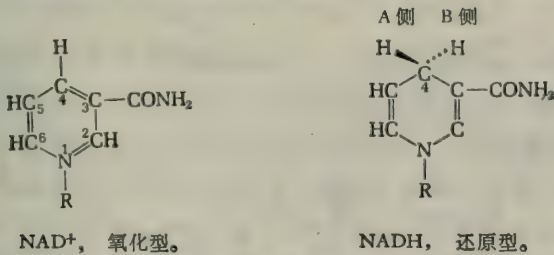


图 18-4 NAD 的氧化型和还原型。在氧化型,其第 4 位氢原子是在吡啶环的平面中;而在还原型,第 4 位上的两个氢原子则在环的平面之外。当用标记有氘的底物对 NAD 进行酶促还原时,按照脱氢酶作用的不同,氘可从环的一侧或另一侧与第 4 位碳原子结合,以生成两种可能产物中的一种。其一是氘在环平面的 A 侧,另一为氘在环平面的 B 侧。请注意氧化型的季氮和还原型中的醌式键系统。

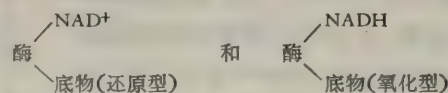
### 需要吡啶的脱氢酶类的动力学和作用机制

需要吡啶的脱氢酶,对底物与吡啶核苷酸两者都表现出特殊的 Michaelis-Menten 行为。采用别章中叙述的一般方法,许多脱氢酶的氧化型和还原型底物以及氧化型和还原型吡啶核苷酸的 Michaelis 常数都已确定,现在表 18-3 中举一例说明。

表 18-3 牛心乳酸脱氢酶的 K<sub>M</sub> 近似值 每值均在其它反应物的饱和浓度下测定

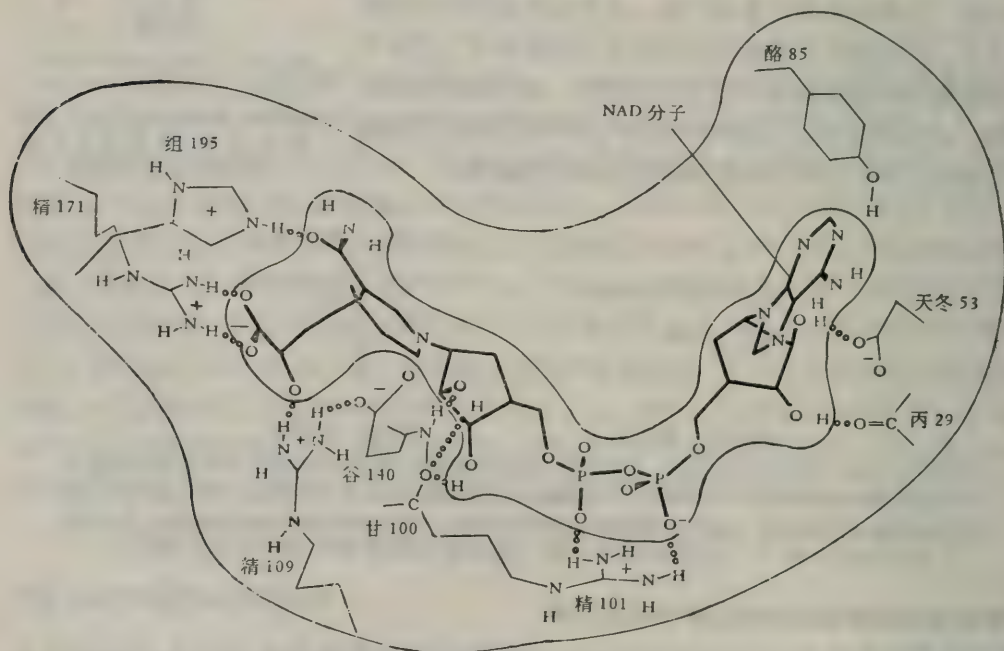
底物	K <sub>M</sub> (mM)
乳酸	9.0
NAD <sup>+</sup>	0.075
丙酮酸	0.14
NADH	0.001

几乎所有经过检查的需要吡啶的脱氢酶类都显示了级次双底物反应 (ordered bisubstrate reactions) 的典型动力学行为。在该项反应中, 往酶的活性部位加入底物和辅酶有规定的顺序。吡啶核苷酸是前导底物, 必须首先结合到酶的活性部位上, 然后底物再结合。在活性部位, 待还原当量从底物转移到辅酶后, 氧化型底物首先分离, 继之以还原型辅酶。因为这种相互作用有规定的顺序, 正常将会形成两个二元复合物(酶-NAD<sup>+</sup>与酶-NADH)以及两个三元复合物, 以参与催化循环:



关于乳酸脱氢酶的重要资料已小结于图 18-5 中。它们是通过各种实验途径, 得自酶

开放型 NAD<sup>+</sup> 结合部位的图解, 显示在酶的活性部位与氨基酸残基发生的特异性结合的相互作用。第二个底物实际上是烯醇式丙酮酸, 图示通过它的亚甲基, 共价连接到尼克酰胺环的第 4 位碳上。图解表明, 为催化活性所必需的第 195 位组氨酸由氢键与尼克酰胺的羰基氧相连。[改绘自 M. G. Rossmann, and Kaplan, N. O. 实验室的 M. J. Adams *et al.* "Structure-Function Relationships in Lactate Dehydrogenase", *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.)*, 70: 1970 (1973)]



形成尼克酰胺-丙酮酸中间产物的可能反应机制, 表明有第 195 位组氨酸参加。一旦组 195 被质子化, 正如下图所示, 它发生移位以和尼克酰胺的羰基氧形成一个氢键。

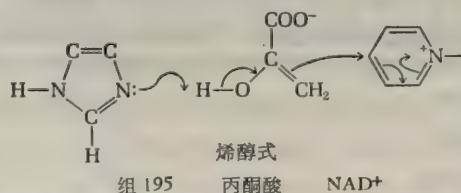


图 18-5 乳酸脱氢酶反应的机制。此酶(分子量 140,000)含有 4 个一致的亚基。每一个亚基先同辅酶——尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD)结合, 然后再同底物结合。从酶的无活性 NAD<sup>+</sup>-丙酮酸复合物的 X 射线分析, 已推论出 NAD<sup>+</sup> 和底物部位的结构。

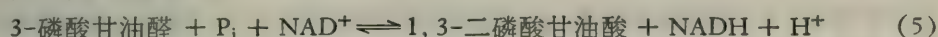


活性部位的几何学与反应机制的研究。这些途径包括晶体酶结构的 X 射线分析、氨基酸顺序,以及有关  $\text{NAD}^+$  和  $\text{NADH}$  分子与脱氢酶蛋白结合时其构象变化的核磁共振研究。乳酸脱氢酶是已经获知立体结构的第一个需要吡啶的脱氢酶。

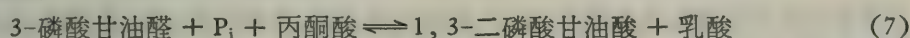
## 需要吡啶的脱氢酶类的平衡

需要吡啶的氧还系统的反应方向和平衡组成,可从  $\text{NADH-NAD}^+$  对 (或  $\text{NADPH-NADP}^+$  对) 的标准氧还电位 ( $E'_0 = -0.32$  伏特) 以及还原型底物-氧化型底物对的标准氧还电位来进行预测。表 18-2 列举了若干底物氧还对的标准氧还电位,这些氧还对能与需要吡啶的脱氢酶类起反应。在所有反应物和产物的浓度都是  $1.0\text{ M}$  的标准状态下进行试验时,标准电位较  $\text{NAD}$  (或  $\text{NADP}$ ) 氧还对为负的底物系统,将倾向于从还原型底物丢失电子以传给氧化型辅酶;而那些具有较正值标准电位的底物系统,则倾向于从  $\text{NADH}$  或  $\text{NADPH}$  接受电子。

由于在各为一种特异性脱氢酶所催化又需要吡啶参加的两个反应中,  $\text{NADH}$  发挥了一种共同性中间产物的作用,故  $\text{NADH-NAD}^+$  系统能将电子从一种底物对转移到另一底物对。例如,在糖酵解的反应序列中,3-磷酸甘油醛通过以  $\text{NADH}$  为共同性中间产物的下列反应,被丙酮酸氧化:



其总方程式为:

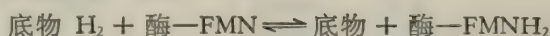


如果我们在  $\text{pH } 7.0$  及所有成分都为等克分子浓度的条件下起动这组反应,则不管中间电子传递体—— $\text{NAD}$ ——的标准电位为何(在热力学计算中,我们仅涉及开始和最终状态,而不是其途径),电子流动的方向将是电子从电负性较强的 3-磷酸甘油醛对 ( $E'_0 = -0.29$  伏特) 到正电性较强的乳酸-丙酮酸对 ( $E'_0 = -0.19$  伏特),所以,总平衡主要朝着乳酸的方向。

因为在需要吡啶的反应中,常会形成或吸收 1 个质子,所以它们的平衡将随着该系统的  $\text{pH}$  值而改变。当大于  $\text{pH } 7.0$  时,每增加 1 个  $\text{pH}$  单位,  $\text{NADH-NAD}^+$  对的标准氧还电位就变得较负 0.03 伏特;当低于  $\text{pH } 7.0$  时,每减少 1 个  $\text{pH}$  单位则变得较正 0.03 伏特。

## 需要黄素的脱氢酶类和氧化酶类

这些酶类含有黄素单核苷酸 ( $\text{FMN}$ ) 或黄素腺嘌呤二核苷酸 ( $\text{FAD}$ ) 作为其牢固结合的辅基。 $\text{FMN}$  或  $\text{FAD}$  参与氧化还原反应的活性部分是核黄素分子的异咯嗪环,它可被可逆地还原 (图 18-6)。可以将反应正式表示为一对氢原子直接从底物传递,以生成  $\text{FMNH}_2$  和  $\text{FADH}_2$  的还原型产物。



在呼吸的主要途径和电子传递中,最重要的需要黄素的脱氢酶类都位于线粒体内,它们是: (1)  $\text{NADH}$  脱氢酶,它含有  $\text{FMN}$ ,能催化电子从  $\text{NADH}$  传递到电子传递链的

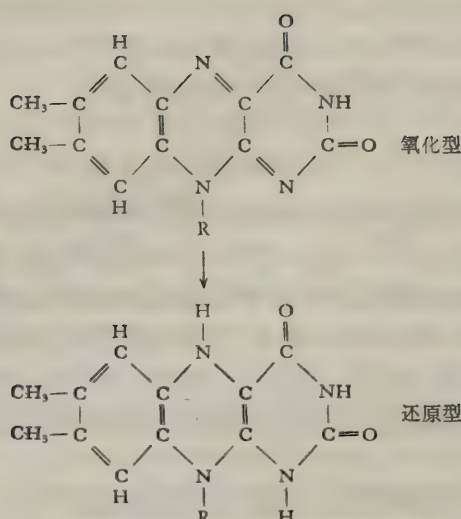


图 18-6 黄素核苷酸的异咯嗪环的还原反应。R 代表黄素核苷酸分子的其余部分，其完整结构式可参看图 13-3。

下一个成员；(2) 琥珀酸脱氢酶，在三羧酸循环中很活跃；(3) 二氢硫辛酰脱氢酶，它是丙酮酸和  $\alpha$ -酮戊二酸脱氢酶系统的一个组分和(4) 酰基辅酶 A 脱氢酶，它催化脂肪酸氧化时的第一个脱氢步骤。还有很多其它的含有黄素的脱氢酶类，它们催化非主要途径的电子传递中特殊的氧化还原反应，如 D-氨基酸氧化酶、黄嘌呤氧化酶、乳清酸还原酶和醛氧化酶等。(表 18-4)

需要黄素的脱氢酶与需要吡啶的脱氢酶显然不同的是：黄素核苷酸与酶蛋白的结合非常牢固，所以它能起辅基而不是辅酶的作用；在催化周期中或周期之后，黄素核苷酸

表 18-4 某些需要黄素的脱氢酶类和氧化酶类的性质

脱 氢 酶 类	分 子 量	黄素核苷酸	金 属
“呼吸主要途径”的			
NADH 脱氢酶类	~300,000†	FMN	Fe
	78,000††	FMN	Fe
琥珀酸脱氢酶	100,000	FAD	Fe
二氢硫辛酰脱氢酶		FAD	无
酰基辅酶 A 脱氢酶		FAD	无
传递电子的黄素蛋白		FAD	无
其它			
3-磷酸甘油脱氢酶		FAD	Fe
D-氨基酸氧化酶	100,000	FAD	无
葡萄糖氧化酶	154,000	FAD	无
黄嘌呤氧化酶	300,000	FAD	Fe, Mo
醛氧化酶	280,000	FAD	Fe, Mo
二氢乳清酸氧化酶	115,000	FMN, FAD	Fe

† 粒子的重量

†† 可溶性部分



并不与酶脱离。在包括 NADH 脱氢酶在内的大多数黄素脱氢酶类，黄素核苷酸是通过非共价键结合，其解离常数在  $10^{-8}$  至  $10^{-11}$  克分子的范围内变动。当暴露于高离子强度或低 pH 的条件下，有时可使这样的黄素酶类离解。但在其它黄素酶类，如琥珀酸脱氢酶，黄素核苷酸借助于 FAD 的异咯嗪环和蛋白质的一个氨基酸残基之间的键而达到共价连接。(图 18-7)



图 18-7 在琥珀酸脱氢酶中 FAD 与一个组氨酸残基的共价连接。R 表示 FAD 分子的其余部分。

按其电子受体反应的能力，可将需要黄素的氧化还原酶分为二类，即脱氢酶类和氧化酶类。在黄素脱氢酶，如 NADH 脱氢酶和琥珀酸脱氢酶，还原型黄素核苷酸被分子氧再氧化的倾向很小或甚至没有。反之，还原型黄素氧化酶可被氧再氧化，生成过氧化氢。属于这一组的酶，有 D-氨基酸氧化酶和黄嘌呤氧化酶。它们所含的黄素核苷酸可以这种方式与蛋白质结合，即使还原型核苷酸可有效地与分子氧起反应。正如本章以后将介绍，在细胞内，从需要黄素的脱氢酶接受电子的直接受体，看来可能是电子传递链的泛醌(辅酶 Q)。然而，还原型黄素脱氢酶类也可以被某些人工的电子受体再氧化，如高铁氰化物，或可还原的染料——甲烯蓝、硫酸甲酯吩嗪、或 2, 6-二氯酚靛酚等(图 18-8)。当这些染料被黄素脱氢酶类还原时，它们的吸收光谱会发生改变，与甲烯蓝的反应即为一例：

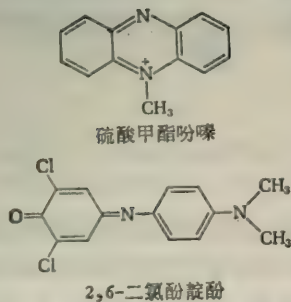


图 18-8 两种可还原的染料，常用来作为从黄素脱氢酶接受电子的人工受体。

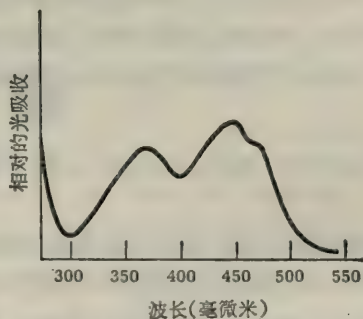
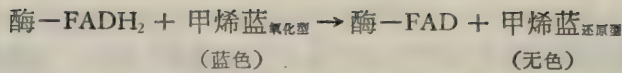


图 18-9 一种完全氧化型的黄素脱氢酶的吸收光谱。若该酶被还原，将引起 450 毫微米附近的吸收峰消失。



由于人工电子受体的这一性质,它们常被用于需要黄素的脱氢酶类的定量分析。

在不同的黄素脱氢酶,其完全氧化型呈黄色、红色、棕色或绿色;在近 370 毫微米和 450 毫微米处常各有一个宽的吸收峰(图 18-9)。当它们经酶促或化学方法被完全还原时,即会褪色,并有 450 毫微米光吸收峰的消失。有些黄素酶在其氧化还原循环中也发生了特殊的荧光改变。

虽然有些黄素蛋白通过两个电子的同时传递可在完全氧化型和完全还原型之间来回变化,而另外一些黄素蛋白在其正常催化循环中似乎只能一次传递一个电子,所以它们可使电子对裂解。由于仅有一个氢原子或电子传递到一个 FAD 或 FMN 分子上(或从一个 FADH<sub>2</sub> 或 FMNH<sub>2</sub> 分子丢失一个氢或电子),这将导致半还原型或半醌型黄素核苷酸的形成。这些属于自由基的形式可以从它们特有的吸收光谱或用电子顺磁共振光谱学加以检定。而后者根据自由基在一个磁场里的特定行为,可以探测它们的存在,也就是探测那些带有不成对的自旋电子的分子存在。

有些黄素蛋白除含有黄素核苷酸外,还含有金属元素,特别是铁和钼;这些金属成分对催化活性是必需的(见表 18-4)。含铁黄素酶类(例如琥珀酸脱氢酶和 NADH 脱氢酶)也特别含有可起反应的硫原子。当用酸处理铁-硫黄素蛋白时,放出 H<sub>2</sub>S。因为这种蛋白不含血红素基,故常将它的铁称为非血红素铁。铁-硫黄素蛋白的铁原子发生了 Fe(II)-Fe(III) 的变化,并可能参与将电子传递到黄素辅基或从黄素辅基传出电子的过程。其它需要黄素的酶类,如黄嘌呤氧化酶和醛氧化酶,则含有钼和铁。

NADH 脱氢酶是电子传递链的一个重要成员,已有许多科学家对它进行了研究。但关于其结构和作用机制还有许多仍待研究。已从线粒体内膜分离出与它结合得很紧的两种不同类型的酶。其一是高分子量颗粒性络合物,它含有近 18 个原子的铁和对酸不稳定的硫及脂类;这一类型的酶能将辅酶 Q 作为受体进行还原,并能被鱼藤酮和阿米妥抑制。另一种是低分子量类型的酶(分子量 78,000),其每个分子仅含有 4 个铁原子和对酸不稳定的硫。与高分子量类型的酶相比,它对抑制剂的敏感性有所改变,并能以不同的特异性与人工的电子受体起反应。有人推测,当低分子量类型的酶在内膜上出现时,它是较大和较天然型酶的亚基。

NADH 脱氢酶的 4 个铁-硫核心,具有不同的标准氧还电位。我们认为,这些核心都能借助 Fe(II)-Fe(III) 的转变来参加电子传递。从最近的研究表明,这些核心之一可以在从 NADH 传递电子到 FMN 辅基的过程中起作用;其它几个铁-硫核心则可能与从 FMNH<sub>2</sub> 传递电子到最终受体——泛醌有关。

## 铁-硫 蛋 白

铁-硫蛋白含有等克分子数量的铁和对酸不稳定的硫。其中首先被发现的是见于巴斯德梭状芽孢杆菌这一种厌氧杆菌的铁氧还蛋白,它具有固定大气中氮的能力。随后又从较高等的植物中分离出相似的蛋白。它们存在于叶绿体中,并参与光合电子的传递。铁-硫蛋白也在其它微生物和动物组织(特别是线粒体)内发现。此外,铁-硫基团也出现



在某些黄素蛋白中(见上节),称为铁-硫核心。

铁-硫蛋白的分子量范围在 6.000—100.000 或更大(表 18-5)。这些蛋白质可能经由可逆的  $\text{Fe(II)}-\text{Fe(III)}$  转变而起电子传递体的作用。 $\text{Fe(III)}$  型呈红色或绿色;还原时它们将部分褪色。在很低的温度下(4—100 开氏温度),大部分铁-硫蛋白的还原型或  $\text{Fe(II)}$  型显示了电子顺磁共振光谱,其特异的信号位于 1.90 和 2.10 高斯(G)之间,这是  $\text{Fe(II)}$  型的未配对电子的指征。图 18-10 表示了有关这些蛋白质的铁-硫基团的一种假想结构。

表 18-5 某些铁-硫蛋白或核心的性质

类 型	分 子 量	每分子的铁-硫核心数	标准氧还电位(伏特)
线粒体			
NADH 脱氢酶	78,000	4	-0.30, +0.03
琥珀酸脱氢酶	100,000	2	0.00
高电位的铁-硫蛋白(包括细胞色素 $c_1$ )			+0.22
其它来源			
铁氧还蛋白(红硫细菌属)	10,000	4	-0.49
铁氧还蛋白(菠菜)	12,000	2	-0.42
皮质铁氧还蛋白(肾上腺皮质)	16,000	2	-0.27
假单胞氧还蛋白(恶臭假单胞菌)	12,000	2	-0.24
铁氧还蛋白(梭状芽胞杆菌)	40,000	2	-0.39

不同的铁-硫蛋白的标准氧还电位,在很大范围内变动,从光合细菌——红硫菌属的强负电性铁氧还蛋白 ( $E'_0 = -0.49$  伏),到牛心线粒体中发现的较正电性的铁-硫核心 ( $E'_0 = +0.22$  伏,见下文讨论)都属此。

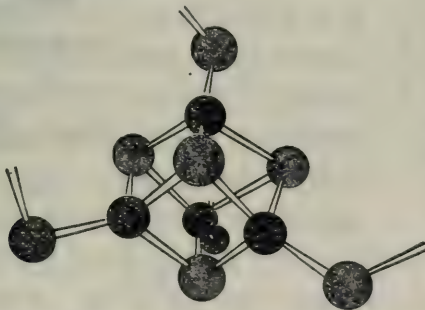


图 18-10 一种假想结构,表明了铁-硫蛋白中铁原子和对酸不稳定的硫原子的位置。深色的是铁原子,浅色代表硫原子。[引自 L. H. Jensen et al., *Biochem. soc. Trans.*, 1: 27 (1973)]

经电子顺磁共振检查,在从 NADH 到氧的线粒体链内,可能至少有 7 种不同的铁-硫核心。其中有 4 个位于 NADH 脱氢酶的络合物内,2 个与细胞色素 b 缔合,1 个与细胞色素  $c_1$  缔合。毫无疑问,虽然它们在电子传递中是很重要的,但有关它们的精确功能尚不清楚。

## 细胞色素类

细胞色素是含铁卟啉基的电子传递蛋白，仅在需氧细胞内发现。有些含于线粒体内膜里，其作用是有顺序地将来自各种脱氢酶系统的电子传递到分子氧。其它细胞色素位于内质网里，在特定的羟基化反应中起作用。所有的细胞色素在其催化循环都发生了可逆的  $\text{Fe(II)}-\text{Fe(III)}$  价数变化。除线粒体呼吸的末端细胞色素，即也含有牢固结合的铜的细胞色素  $a_3$  或细胞色素  $c$  氧化酶外，细胞色素的还原型不能被分子氧氧化。在高等动物的线粒体内，其呼吸链的研究最为充分，至少已有五种不同的细胞色素从其内膜鉴定出来，包括细胞色素  $b$ 、 $c_1$ 、 $c$ 、 $a$  和  $a_3$ 。至少其中一种(细胞色素  $b$ ) 是以两种或两种以上的形式存在。除在线粒体内膜发现的那些细胞色素以外，还有另一类(细胞色素  $b_5$ ) 含于内质网中。动物和植物细胞也含有其它的血红素酶类，如过氧化物酶和过氧化氢酶。

卟啉环不仅存在于各种血红素蛋白，而且也存于绿色植物细胞的叶绿素中。在它们的结构里，卟啉被认为是一种四吡咯母体化合物——卟吩的衍生物(图 18-11)。卟啉可

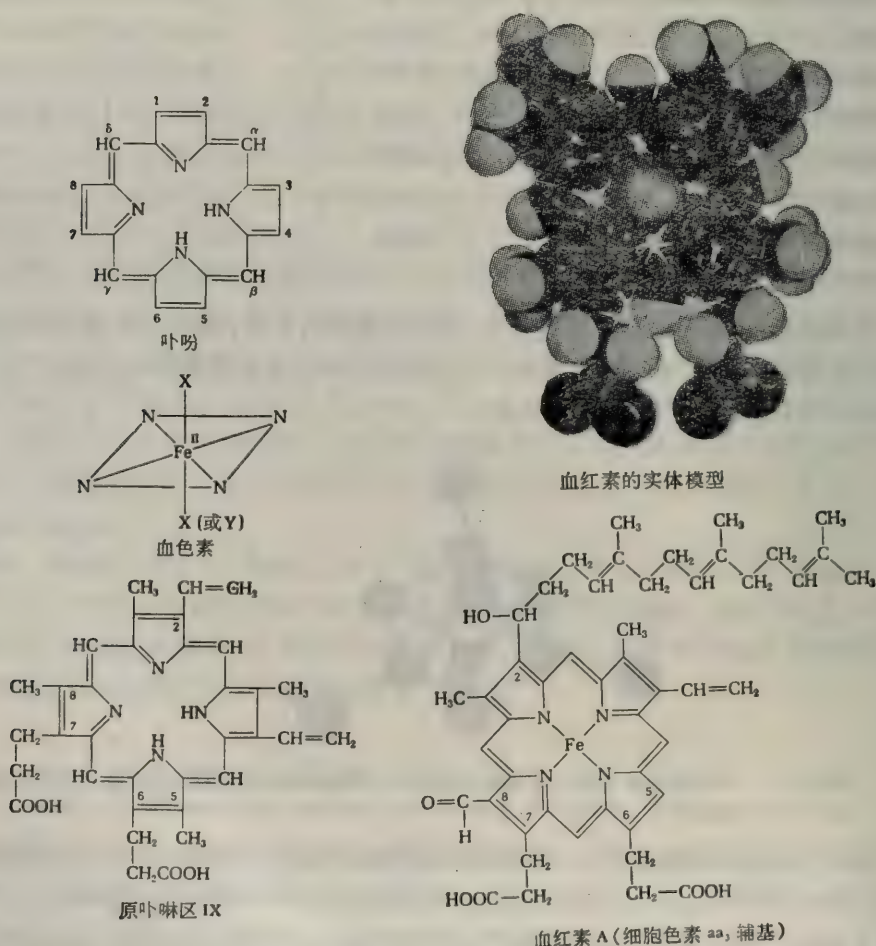


图 18-11 卟吩、原卟啉和血红素的结构。



根据其侧链上的取代基进行命名和分类,例如白色卟啉、中卟啉、尿卟啉、粪卟啉和原卟啉等。其中原卟啉是最丰富的,它含有四个甲基,两个乙烯基和两个丙酸基。根据上述这些基团在 8 个可利用的侧链位置上被取代的次序不同,可以写出 15 种不同的同分异构原卟啉。在这样众多的可能形式中,其中之一的原卟啉 IX (图 18-11) 是存在于自然界的唯一形式。血红蛋白、肌红蛋白和大多数细胞色素都含有它。

通过四条配价键同金属元素相连,原卟啉可与铁、镁、锌、镍、钴和铜离子等形成四配位体(“四齿”)螯合的络合物。原卟啉与  $\text{Fe(II)}$  形成的这种螯合物称为原血红素,或简称为血红素;与  $\text{Fe(III)}$  形成的一种类似络合物,则称为高铁血红素或羟高铁血红素。在血红素中,卟啉的四个配体基与铁形成一个正方形平面的络合物,所剩下的铁的第五和第六个配位则同卟吩环的平面垂直。当铁的第五和第六个配位被占据后,形成的结构即为血色素或血色原(图 18-11)。在肌红蛋白和血红蛋白等血红素蛋白类中,其第五个位置被一个组氨酸残基的咪唑基所占据,而其第六位置或未被占据(如脱氧血红蛋白和脱氧肌红蛋白)、或被氧占据(如氧合血红蛋白与氧合肌红蛋白)、或被一氧化碳等其它配体基所占据。另一方面,几乎在所有的细胞色素中,其铁的第五和第六位置由蛋白质的特殊氨基酸残基的 R 基团所占据。所以这些细胞色素不可能与氧、一氧化碳或氰化物等配体基相结合;一个重要的例外是细胞色素  $a_3$ , 它的生物学功能是可以正常地与氧结合。

在血红蛋白与肌红蛋白的正常功能中,当铁原子同氧结合和失去氧时其原子价不变,即始终保持在  $\text{Fe(II)}$  状态。但是血红蛋白和肌红蛋白两者都能被高铁氰化钾一类氧化剂氧化成  $\text{Fe(III)}$  或高铁血红素的形式,其颜色由红色变成褐色。它们的相应产物称为高铁血红蛋白和高铁肌红蛋白,它们不再能可逆地起氧的载体作用。然而细胞色素的铁原子可在  $\text{Fe(II)}$  和  $\text{Fe(III)}$  形式之间进行可逆的变化;细胞色素担任电子传递体,而血红蛋白与肌红蛋白则起着配体(氧)的载体作用。

1866 年 MacMunn 首先发现细胞色素类,并命名为组织羟高铁血红素。但是关于它们在生物氧化中的意义仍然未能阐明,直到 1925 年 Keilin 在英国再次发现它们。他用一台简易的手动分光镜进行直接观察,发现完整的昆虫肌肉显有许多吸收带,它们类似还原的血红素蛋白的那些吸收带。他还证明,这些吸收带的出现和消失与肌肉活动有关。Keilin 将这些呼吸色素重新命名为细胞色素类,并假设它们在一条链上起作用,把电子从营养物分子转运到氧。同时根据在还原状态下它们的吸收带所在的特殊位置,将它们分为  $\alpha$ 、 $\beta$  和  $\gamma$  三种主要类型。于可见光区,每类还原状态的细胞色素都具有三条清晰的吸收带,即  $\alpha$  带、 $\beta$  带和  $\gamma$  带(或 Soret 带)。(图 18-12, 表 18-6)

细胞色素通常与线粒体膜非常牢固地结合,故难获得可溶性和均一的形式。但只有一个例外,这就是细胞色素  $c$ , 它很易用浓盐溶液从线粒体提取。许多生物种属的细胞色素  $c$  已制得晶形,并已确定其氨基酸顺序。细胞色素  $c$  的含铁原卟啉基团通过卟啉环和其肽链中两个半胱氨酸残基之间的硫醚键,与蛋白质

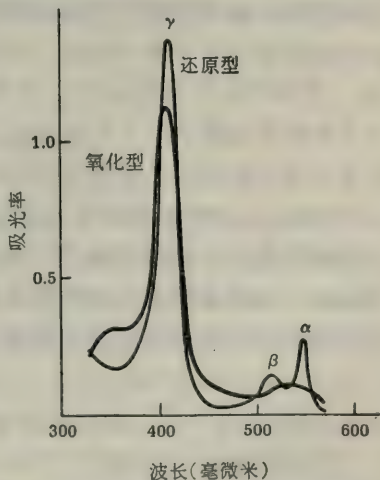


图 18-12 细胞色素  $c$  的吸收光谱(光径 1.0 厘米;  $10 \mu M$  溶液; pH 7.0)。还原型的  $\alpha$  谱峰(550 毫微米)的克分子吸收系数是  $27.7 \text{ 厘米}^2/\text{克分子}$ 。

呈共价结合。在常见的血红素蛋白中,只有细胞色素 c 借助于共价键使血红素同蛋白质相结合。正如细胞色素 b 和 a 一样,在血红蛋白和肌红蛋白中,由于其卟啉环呈非共价结合,所以可以用吡啶或其它溶剂提取酸化了的蛋白质而移除之。一般认为,在细胞色素 c 中,其铁的第五和第六配位由一个组氨酸残基和蛋氨酸残基的侧链所占据,因而阻碍细胞色素 c 在 pH 7.0 时与氧或一氧化碳起反应。现将各种细胞色素的一些性质摘录于表 18-6 中。

表 18-6 线粒体细胞色素的性质

细胞色素	分子量	$E_0'$ (伏特)	还原型的最大吸收(毫微米)		
			$\alpha$	$\beta$	$\gamma$
$b_k$	25,000	+0.030	563	532	429
$c_1$	37,000	+0.225	554	524	418
c	12,500	+0.235	550	521	415
a	200,000	+0.210	600	—	439
$a_3$		+0.385	603.5	—	433

细胞色素 a 和  $a_3$  合称为细胞色素 c 氧化酶、呼吸酶或亚铁细胞色素 c-氧的氧还酶。对这些酶值得我们特别注意。它们不含有血红素而含有血红素 A, 后者与血红素不同之处,在于其第 8 位上以一个甲酰基取代了甲基,其第 5 位上没有甲基,在第 2 位上有一个长的疏水性 17 碳的类异戊二烯侧链,而不是乙烯基(图 18-11)。在结构上卟啉 A 与叶绿素的卟啉类似,因为后者也有一个长的类异戊二烯侧链。

关于细胞色素 a 和  $a_3$  的结构和作用机制,仍有一些未肯定的地方。多年来认为它们是二个不同的物质,因为它们的血红素与氰化物和一氧化碳可以起不同的反应,并产生不同的光谱。但是现似已肯定,细胞色素 a 和  $a_3$  结合在同一个大的寡聚体蛋白分子中;两者的血红素在化学上有一致性,但对某些配体的反应性不同。这种络合物可作为细胞色素  $aa_3$ 。其分子量约为 200,000,并含有许多分子大小不同的亚基。该酶含有两个血红素 A 分子和两个铜原子。a 的血红素从细胞色素 c 接受电子,然后传递给  $a_3$  的血红素。细胞色素 c 氧化酶的两个铜原子能发出特定的电子顺磁共振信号,并在电子传递时遭受  $Cu(II)-Cu(I)$  转变,因此认为它们能催化电子从  $a_3$  的血红素传递到氧。氰化物可抑制还原型细胞色素  $a_3$  被氧再氧化;硫化氢也有相似的作用。细胞色素  $a_3$  也像血红蛋白一样,可以和一氧化碳结合,推测它发生在正常被氧占据的位置上。一氧化碳对细胞色素氧化酶的抑制作用能被可见光的照明所逆转。细胞色素  $aa_3$  的作用将在下面进一步讨论。

### 泛醌(辅酶 Q)

除上述电子传递蛋白外,在线粒体的呼吸链上,脂溶性的电子传递辅酶,泛醌或辅酶 Q,也参与将电子从有机底物转运到氧的过程。该辅酶属于一种能可逆还原的醌,带有长的类异戊二烯侧链(图 18-13)。它首先为 Morton 发现,由于它广泛地存在于动物、植物和微生物,故命名为泛醌。随后,Crane 及其同事发现了线粒体内有一种脂溶性醌,推测其功能为传递电子,他们称为辅酶 Q(取自“醌”的第一个字母 Q),后来发现它与泛醌是一致的。



实际上已经知道有几种泛醌，它们只是类异戊二烯侧链的长度不同。有些微生物有 6 个异戊二烯单位，而在动物组织的线粒体内则有 10 个异戊二烯单位（图 18-13）。植物组织内与泛醌密切有关的质体醌（plastoquinones），可在光合性电子转移中执行相同的功能。

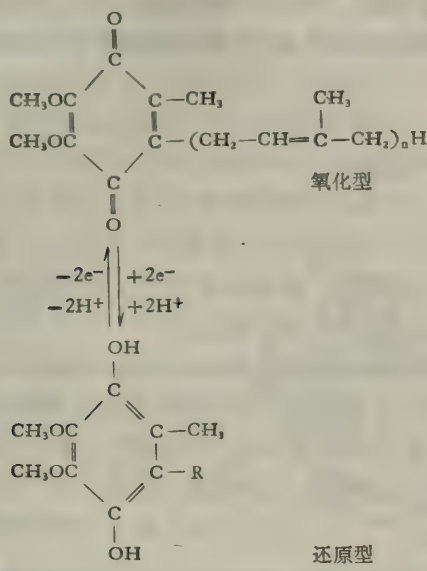


图 18-13 泛醌或辅酶 Q。其氧化型或醌型在 290 毫微米处有强烈的光吸收。CoQ<sub>n</sub> 存在于某些微生物中，而大多数哺乳动物的线粒体内则含有 CoQ<sub>10</sub>（对 CoQ<sub>6</sub>， $n = 6$ ；而对 CoQ<sub>10</sub>， $n = 10$ ）。

泛醌在 270—290 毫微米有一特殊的光吸收带，当泛醌被还原为氢醌形时即消失；可以利用这一光谱的变化来观测泛醌的氧化和还原。

### 电子传递途径：呼吸链

一种概念认为，有一条电子传递体链能从底物分子将电子传给分子氧。这概念代表着两方面研究工作的合流。1900—1920 年间，生物氧化的早期研究者，尤其是 Thunberg 已发现一些脱氢酶，它们能在完全缺氧的情况下催化从不同的代谢物脱去氢原子的反应。Wieland 后来从这些实验推测，氢原子的活化作用是生物氧化涉及的基本过程，并认为分子氧不需要被活化以同脱氢酶生成的活化氢原子起反应。但是 1913 年 Warburg 发现，很低浓度的氰化物几乎能完全抑制正在呼吸的细胞和组织的氧消耗。因为氰化物不抑制脱氢酶，但能与铁形成十分稳定的络合物（例如高铁氰化物），故他假设生物氧化需要一个含铁的酶（“呼吸酶”）。按照他的观点，通过此酶使氧激活就是生物氧化涉及的基本机制。匈牙利的 Szent-Györgyi 随后综合了 Wieland 和 Warburg 的不同观点（即氢的激活对比氧的激活），从而提出这两过程都会发生，黄素蛋白则在脱氢酶类和“呼吸酶”之间起着中间电子传递体的作用。同样 Keilin 也提供了重要的证据，指出细胞色素可以组成连续系列的电子传递体。他和其它的研究者 D. E. Green, K. Okunuki, T. Singer, T. King 和 E. Racker 等从纯制组分开始，进行了体外重建电子传递链片段的实验。

图 18-14 和表 18-7 中载明了呼吸链内从 NADH 到氧的电子传递反应序列,这些序列现已很好阐明。NADH 是通过需要 NAD 的脱氢酶的作用从许多不同底物收集电子的形式。这些电子通过黄素蛋白——NADH 脱氢酶汇入链内。另一方面,其它的呼吸底物由需要黄素的脱氢酶脱氢,如琥珀酸脱氢酶和乙酰辅酶 A 脱氢酶。它们经由泛醌将电子汇集入链内(图 18-14)。因此,  $\text{NAD}^+$  和泛醌的作用是分别从需要吡啶和需要黄素的脱氢酶所氧化的呼吸底物收集还原当量,这再一次说明了分解代谢途径中的集中原则。

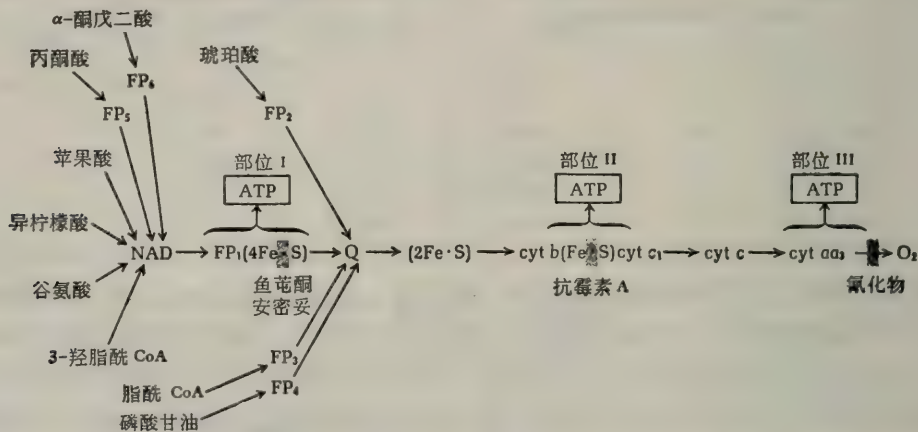


图 18-14 哺乳动物线粒体的呼吸链。图中表明了来自不同底物的电子的进入点、对电子转移的抑制部位,以及能量以 ATP 形式储存的可能部位。略号 FP 代表黄素蛋白;  $\text{FP}_1$  为 NADH 脱氢酶。  $\text{Fe} \cdot \text{S}$  表示铁-硫核心,其在链上的位置仍未肯定。Q 是指泛醌(辅酶 Q)。

表 18-7 电子从 NADH 传递到氧的序列反应(写成平衡式)

并非全部的已知传递体包括在此表内,如细胞色素  $c_1$  和某些铁-硫核心未予载入;下表特别标明了  $\text{H}^+$  (黑体) 在一些反应中的生成和利用。

$\text{NADH} + \text{H}^+ + \text{FMN} \rightleftharpoons \text{NAD}^+ + \text{FMNH}_2$
$\text{FMNH}_2 + 2 \text{Fe} \cdot \text{S(II)} \rightleftharpoons \text{FMN} + 2 \text{Fe} \cdot \text{S(III)} + 2 \text{H}^+$
$2 \text{Fe} \cdot \text{S(II)} + 2 \text{H}^+ + \text{Q} \rightleftharpoons 2 \text{Fe} \cdot \text{S(III)} + \text{QH}_2$
$\text{QH}_2 + 2 \text{cyt. b(III)} \rightleftharpoons \text{Q} + 2 \text{H}^+ + 2 \text{cyt. b(II)}$
$2 \text{cyt. b(II)} + 2 \text{cyt. c(III)} \rightleftharpoons 2 \text{cyt. b(III)} + 2 \text{cyt. c(II)}$
$2 \text{cyt. c(II)} + 2 \text{cyt. a(III)} \rightleftharpoons 2 \text{cyt. c(III)} + 2 \text{cyt. a(II)}$
$2 \text{cyt. a(II)} + 2 \text{cyt. a}_3(\text{III}) \rightleftharpoons 2 \text{cyt. a(III)} + 2 \text{cyt. a}_3(\text{II})$
$2 \text{cyt. a}_3(\text{II}) + 1/2 \text{O}_2 + 2 \text{H}^+ \rightleftharpoons 2 \text{cyt. a}_3(\text{III}) + \text{H}_2\text{O}$

注解 FMN = NADH 脱氢酶的辅基;  $\text{Fe} \cdot \text{S}$  = 一种铁-硫蛋白或核心的辅基, Q = 泛醌; cyt. = 细胞色素; 罗马字 II 和 III, 代表铁的氧化-还原状态。

图 18-14 表明的从 NAD 传到氧的顺序,得到了几方面证据的支持。第一,它与不同的电子传递体的标准氧还电位是一致的。当电子从底物传到氧时,该电位变得较正(表 18-1)。第二,用分离出的电子传递体完成的体外重建实验表明, NADH 能够还原 NADH 脱氢酶,但不能直接还原细胞色素 b、c、或细胞色素  $\text{aa}_3$ 。同样,还原型 NADH 脱氢酶不能直接与细胞色素 c 起反应,而需要泛醌和细胞色素 b 与  $c_1$  的存在。第三,已从线粒体分



离出含有功能上相关的传递体的络合物,如细胞色素  $b$ 、 $c_1$  与铁-硫蛋白的络合物,以及 NADH 脱氢酶与一个或多个铁-硫蛋白的络合物。

最重要和直接的证据,也许来自当各个电子传递体在完整线粒体中起作用时观察其氧化还原状态。其方法是进行差光谱的测定,这就是 Chance 和 Williams 所发展的那种实验步骤。因为线粒体悬浮液是混浊的,并可吸收和散射许多光,所以在完整线粒体内,不能用直接分光光度法测定其电子传递体的吸收光谱。然而却可能测定这样一种混浊的悬浮液中含有的还原状态的传递体数量。即用敏感的分光光度计,以传递体呈氧化状态的线粒体作空白或对照悬浮液进行对比,读出前一悬浮液的光吸收。这样,就消除了悬浮液的浊度所引起的大量光吸收(图 18-15)。当离体的线粒体处于有氧的稳态时,如允许它氧化三羧酸循环的中间产物,则差光谱将表明,最靠近呼吸链的还原或底物末端的电子传递体(指 NAD),就是该链在有氧稳态下具有最强还原性的成员;而在氧末端的电子传递体(指细胞色素  $aa_3$ ),几乎完全是氧化型。在有氧的稳态下,按照从底物到氧的方向,呼吸链内的中间电子传递体依次处于一个比一个更为氧化的形式,显示电子沿着一个从 NAD 到氧的梯度而流动。在另一分光光度方法中,当有过量底物存在时往线粒体的无氧悬浮液内通入氧,曾利用传递体被再氧化的速度和顺序进行观察。在无氧状态下,所有的传递体完全被还原;当通入氧时,首先是还原型细胞色素  $aa_3$  变为氧化型,继之以细胞色素  $c$ ,然后是细胞色素  $b$ ,最后是 NADH 的再氧化。重要的是,必须强调差光谱不是还原型电子传递体的光谱,而是其还原型和氧化型光谱之间的差值。

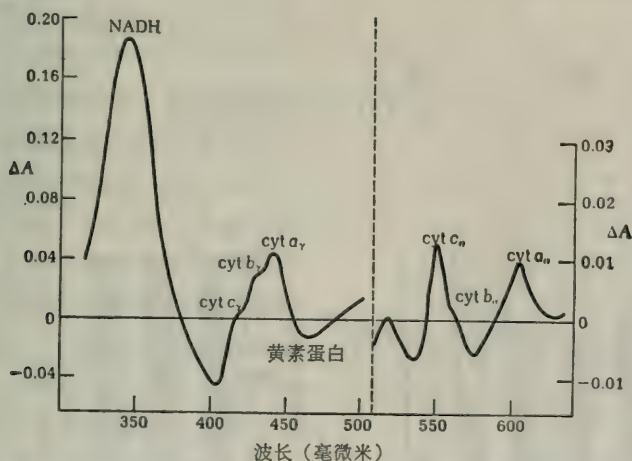


图 18-15 完整的大白鼠肝脏线粒体内充分还原的电子传递体的差光谱。使空白或对照悬浮液保存在充分的氧饱和条件下,以维持电子传递体的氧化状态。将传递体保存在充分还原状态的第二个线粒体悬浮液,同上述这个对照进行参比读数,于过量呼吸底物存在下,如造成悬浮液绝氧,就能达到充分还原态。还原型细胞色素  $c_1$  的谱峰未在图上表明,只是在极低的温度下,才可能将它们与细胞色素  $c$  的谱峰相区别。

有关电子传递动力学的其它方面内容,将放在第十九章中“氧化磷酸化”之后讨论。

## 电子传递的抑制剂

在电子传递链上能阻断特异性传递体的抑制剂,对研究呼吸链上电子传递体的顺序

也提供了有价值的情报。在 NADH 和泛醌之间的链距上,已发现有三个可阻断电子转移的抑制剂: 鱼藤酮是一种很毒的植物制剂,南美印第安人用它作为毒鱼剂,而现在作为杀虫剂;阿米妥——一种巴比土酸盐药物;匹杀丁 (Piericidin)——一种抗菌素,它们在结构上很像泛醌,因此可以同后者竞争。现认为这些化合物(图 18-16)可作用于 NADH 脱氢酶。另一种特殊的抑制剂是抗菌素抗霉素 A,它是从淡灰链丝菌分离出来的,能阻断从细胞色素 b 到 c 的链距上的电子传递。第三类抑制剂则阻断从细胞色素  $aa_3$  到氧的电子传递;它包括氰氢酸、硫化氢和一氧化碳。用能产生一个“交叉点”的抑制剂处理有呼吸活性的线粒体,并在此处理的前后对不同电子传递体的氧化还原状态进行分光光度的观测,由此确定了这些抑制剂的作用部位(图 18-17)。这样的交叉点对鉴定多酶序列中的限速步骤是有用的;利用交叉点的另一个例子将在以后另章讨论。

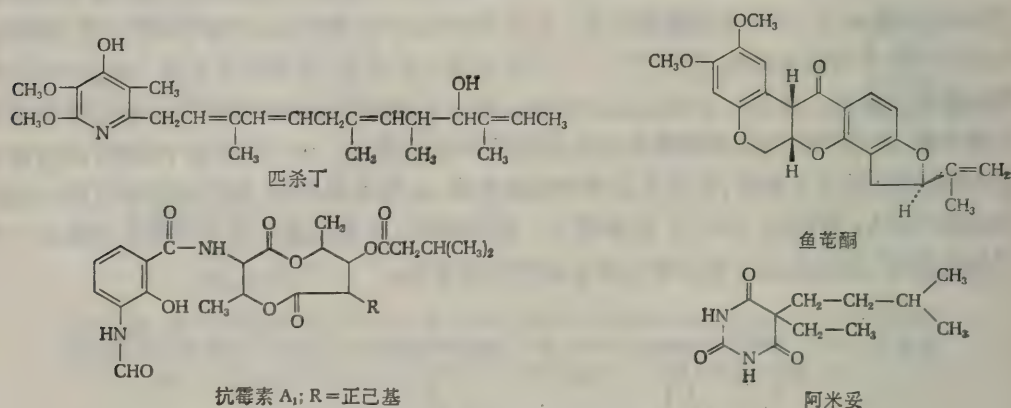


图 18-16 电子传递的抑制剂

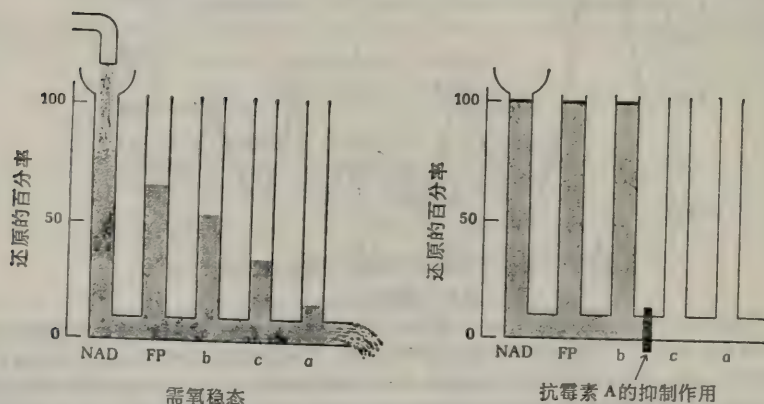


图 18-17 在需氧稳态和受抑制后,电子传递体的还原状况的水力学模拟图解。抑制作用将产生一个交叉点;位于交叉点左侧的传递体变得更加还原,而其右侧的传递体则变得更加氧化。这种交叉现象常用于多酶体系中调节点的鉴定(FP 代表黄素蛋白)。

## 电子传递时的质子交换

电子传递链的另一个既特殊而又重要的性质,是在某些电子传递的序列反应中有氢



离子生成和被利用(表 18-7)。有些电子传递体如 NADH 和泛醌,能以氢原子的形式传递电子;而细胞色素类则以电子本身的形式传递电子,显然不获得或丢失  $H^+$ 。直到几年前,这些质子交换的可能意义还完全被忽视。但我们将看到,现在认为这些生成质子和吸收质子的反应,在保存电子传递的能量方面起着重要作用。

### 关于线粒体电子传递链的一些未能肯定的问题

虽然许多证据表明,铁-硫蛋白或核心在从 NADH 到氧的电子传递体链的某些点上起作用(图 18-14),但是其精确定位和功能尚不清楚。也应指出,现已知道细胞色素 b 存在有两种形式,即细胞色素  $b_K$  和细胞色素  $b_T$ 。两者的标准氧还电位不同。虽然推测细胞色素  $b_T$  可能在传递电子时的能量传导机制中发挥作用,但对这两种形式的功能仍未阐明。

另一个未能肯定的问题,涉及在呼吸链的每一步骤中电子转移的数目。一般认为,在 NAD 和泛醌之间的电子传递有两个电子步骤;而从细胞色素 b 到氧则为一个电子步骤的传递(图 18-18)。在另一方面,将一个氧分子还原成两个水分子共需 4 个电子。关于呼吸链的电子流如何协调产生 4 个电子,以保证一个氧分子的完全还原,目前尚不清楚。一种意见是,细胞色素可能成对地起作用。这是一个特别重要的问题,因为氧分子的部分还原会产生剧毒产物。单个电子还原将产生超氧根( $O_2^-$ ),而 2 个电子的还原反应则生成过氧化氢。这两种产物的反应性都很高,对存在于生物分子内的某些类型的功能基有潜在的破坏力。新近增多的证据说明,在动物组织内当氧被还原时事实上已产生了超氧化物和过氧化氢(见本章后面讨论)。

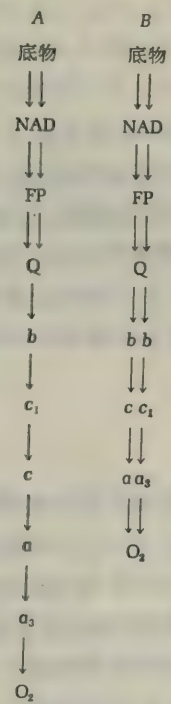


图 18-18 电子传递模式。在(A)式中,直到辅酶 Q 为止,电子的传递是两个电子步骤,而其后则是一个电子步骤。在(B)式中,全部传递都是两个电子步骤。

### 电子传递的能学

当标准氧还电位已知的两个共轭氧还对相互起反应时,其发生的标准自由能变化,可用下列方程式求得:

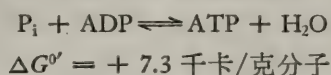
$$\Delta G^{\circ'} = -n\mathcal{F}\Delta E^{\circ'}$$

此处  $n$  是被传递的电子数目,  $\mathcal{F}$  是法拉第 (23,062 卡),而  $\Delta E^{\circ'}$  是受电子偶联的  $E^{\circ'}$  减去供电子偶联的  $E^{\circ'}$  所得的差值。利用这个关系,我们可以算出一对电子当量从 NADH

( $E'_0 = -0.32$  伏特) 转移到分子氧 ( $E'_0 = +0.82$  伏特), 亦即运行了呼吸链的全长时所发生的标准自由能变化:

$$\Delta G'^0 = -2 \times 23,062 \times [0.82 - (-0.32)] = -52,700 \text{ 卡/克分子} \\ = -52.7 \text{ 千卡/克分子}$$

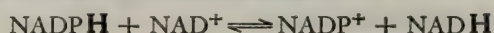
这种热力学的计算, 当然与电子运行途径无关, 也无须知道妨碍电子传递的分子。因此, 在一对电子当量从 NADH 经呼吸链传递到分子氧时, 其自由能的降低是极大的(大约 53 千卡)。这个数值可以同 pH 7.0 时从 ADP 和磷酸生成 ATP 的标准自由能对比:



显然, 在一对电子从 NADH 转移到分子氧的过程中, 假若能量偶联机制是有效的, 其自由能的下降已足够大到在标准状况下从 ADP 和磷酸合成几个分子的 ATP, 而不是恰好合成一个分子。今天我们已经知道, 在氧化磷酸化或呼吸链的过程中, 一对电子通过从 NAD 到氧的呼吸链生成 3 个分子的 ATP, 这些将在下一章再讨论。但是这种能量转换的精确机制尚未完全肯定。呼吸链的电子转移组分没有一个是磷酸化的形式出现。事实上, 还没有证据说明, 目前分离出来的任何一个电子传递体含有能作为合成 ATP 的一种能量供体的化学基团。然而, 有两个电子传递过程的突出特性与电子传递时的能量守恒机制有关: (1) 事实是涉及大量序列的电子转移步骤, 表明有能量逐步释放。(2) 另一事实是, 在某些步骤吸收和释放  $H^+$ , 表明能量转换中有质子交换。

## 吡啶核苷酸转氢酶

动物组织和微生物含有催化下列总反应的酶:



这一反应允许呼吸链利用 NADPH 的还原当量, 它通常从作为直接供体的 NADH 接受电子。在逆向反应中, 为了生物合成目的而允许  $NADP^+$  还原。可将这样的酶称为吡啶核苷酸或  $NAD(P)^+$  转氢酶。

动物组织的  $NAD(P)^+$  转氢酶位于线粒体膜内, 可以用去垢剂提取。在完整线粒体内, 其转氢酶反应的方向取决于电子传递所产生的能量和 ATP 的存在。从 NADPH 到  $NAD^+$  的反应速率一般大于其逆向反应。但是当电子传递链产生能量和有过多的 ATP 存在时, 电子倾向于从 NADH 传递到  $NADP^+$ , 它产生的 NADPH 量将超过从平衡常数所预估的浓度。即令此效应的机制仍不清楚, 但这样生成的 NADPH 会在生物合成反应中作为一种还原剂而发挥重要作用。

## 其它膜系统内的电子传递

电子传递不仅发生在线粒体内, 也发生在其它类型的膜系统内。异养菌实现电子传递的情况, 原则上与动物线粒体很相似。这些原核生物没有线粒体, 包括黄素蛋白、铁-硫蛋白和细胞色素等在内的电子传递体, 均位于细胞膜内。确实, 异养菌的细胞膜与线粒体的内膜具有同系的功能。这一事实强烈支持了关于在真核细胞进化过程中线粒体起源于



细菌的假说。大多数需氧的革兰氏阴性细菌,可利用泛醌作为从黄素蛋白收集电子的“收集器”;而革兰氏阳性细菌似乎能利用维生素K或其一种衍生物来达到此目的,大肠杆菌则含有泛醌和维生素K<sub>3</sub>。

在原核和真核的光合生物,含有黄素蛋白、铁-硫蛋白与细胞色素的电子传递体链,参与了光诱导的光合电子传递。

我们也相信,电子传递发生在真核细胞的核内,虽然与线粒体呼吸比较,它仅仅是少量的。细胞核电子传递时生成的ATP可用于核酸的生物合成。

线粒体的、细菌的和光合的电子传递过程,作为贮存氧化能量的手段,每伴有ADP的偶联磷酸化作用。但是还有其它特殊类型的电子传递过程可导致氧的还原而不伴有磷酸化作用。

## 通过加氧酶来利用氧

虽然大部分被需氧细胞消耗的分子氧,靠流向线粒体呼吸链的电子而还原成水,却仅有少量的氧用于酶促反应。在此反应中,氧分子的一或两个原子可直接插入有机底物的分子以生成羟基。催化该种反应的酶,称为加氧酶。它共有两类:二加氧酶能催化氧分子的两个原子插入有机底物分子;而单加氧酶则催化只插入一个氧原子的反应。

### 二加氧酶

二加氧酶也叫氧转移酶,它催化下列类型的反应:



其中AH<sub>2</sub>为底物分子,而A(OH)<sub>2</sub>是它的二羟基化形式;这样引入的二个羟基通常处于相邻位置。这种反应的产物A(OH)<sub>2</sub>常不稳定,其羟基之间的碳-碳键可自发地裂解。已用<sup>18</sup>O同位素作示踪物证明,分子氧的两个氧原子可直接插入底物。

有些二加氧酶已制得高度纯品,看来全部都含有铁,以不稳定的铁-硫键或血红素的形式存在;少数也含有铜。一个重要的例子是色氨酸吡咯酶,其新近推荐的名称是色氨酸2,3-二加氧酶。这是能催化色氨酸氧化降解中一个步骤的一种血红素酶。在此反应中,二个氧原子被引入色氨酸的六元环,生成了不稳定的邻位二羟基产物,后者又可自发地分解,其芳族环裂解成L-甲酰犬尿氨酸(图18-19)。二加氧酶的其他例子将另述。

### 单加氧酶

单加氧酶或羟化酶能催化分子氧的一个氧原子插入有机底物;另一个氧原子被还原成水。单加氧酶需要一个第二种底物供应电子,以使氧分子中的第二个氧原子还原成水。因此,单加氧酶也称为混合功能加氧酶。这种反应的总方程式如下:



其中AH是受羟化的底物,XH<sub>2</sub>是电子供体,AOH是已羟化的底物,X是氧化型电子供体。用<sup>18</sup>O作为示踪物已确定,氧分子的两个氧原子之一(黑体)在羟化产物中被收回,而另一个氧原子则在形成的水里回收。

在大多数的单加氧酶反应中,供给电子使一个氧原子还原成水的第二种底物,最终虽

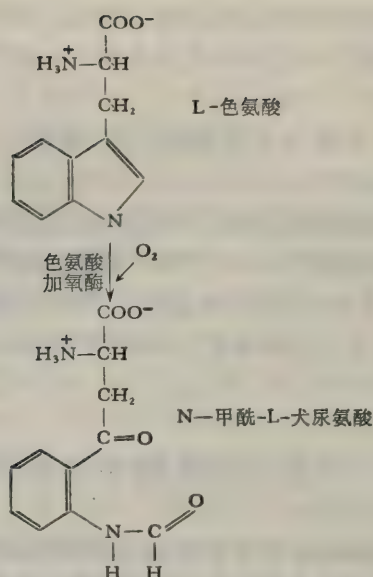
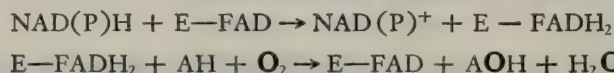


图 18-19 色氨酸加氧酶反应，显示氧分子的两个原子插入底物的过程。

是 NADH 或 NADPH，但是采用了不同的电子传递体将电子从 NADPH 或 NADH 转移到氧。

那些在细菌体内发现的最简单的单加氧酶是含有 FAD 的黄素蛋白，它催化以下序列反应：



E 代表加氧酶蛋白，AH 为底物（通常是一种芳族化合物），而 AOH 是它的羟化产物。

有些较复杂类型的单加氧酶反应是由肝脏的苯丙氨酸羟化酶（现在建议采用的新名称为苯丙氨酸-4-单加氧酶）所催化。在此反应中，最后的电子供体是 NADPH，需要由它把一个氧原子还原成水。但是，还原当量是通过四氢生物蝶呤转移的。它是一种结构类似四氢叶酸的辅酶。反应的全序列见另处讨论。

## 微粒体的电子传递

在动物组织内，很多羟化反应利用了较上述单加氧酶和二加氧酶更复杂的酶。内质网（即微粒体部分）含有与膜结合的非磷酸化电子传递系统，后者不仅参与羟化作用，也参与去饱和反应。肝脏的一个微粒体电子传递系统，含有一种称为 NADPH-细胞色素 P450 还原酶的黄素蛋白和一种特殊的微粒体细胞色素——细胞色素 P 450（常简称为 P 450）；在有些生物，铁-硫蛋白也参与其中。第一步，有一个电子当量从 NADPH 传递到黄素蛋白的半醌型，使后者完全还原。电子从还原型黄素蛋白传递到 P 450 的氧化型或 Fe(III) 型，后者仅在肝细胞的微粒体内发现有，而肝线粒体则缺如；它在 420 毫微米处有一条  $\alpha$  光带，是一种 B 类细胞色素。P 450（P 代表色素）首先由以下事实所确认：其还原型的一氧化碳衍生物在 450 毫微米处呈现最大吸光率。P 450 的还原型 [Fe(II)] 与分子氧以这



另一种方式起反应,即一个氧原子被还原成水,而另一个则被引入有机底物中。(图18-20)

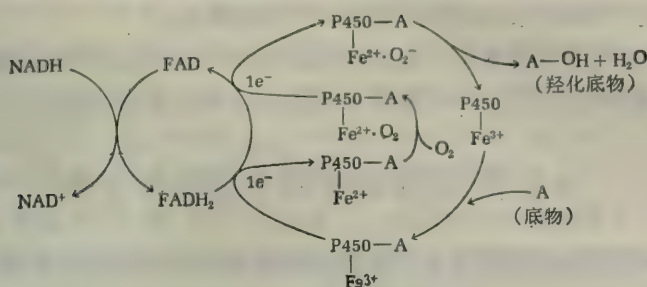


图 18-20 肝脏微粒体 P 450 系统使有机底物羟化的设想机制。底物首先与 P 450 的 Fe<sup>3+</sup>型结合, 后者再被来自 NADH 的一个电子还原成 Fe<sup>2+</sup>型。继而 Fe<sup>2+</sup>型发生氧合, 来自 NADH 的第二个电子将结合氧转变为 O<sub>2</sub><sup>-</sup>根。由此引起内部氧还作用, 形成了羟化底物和含有以 O<sub>2</sub>形式引入的氧原子的 H<sub>2</sub>O。游离的 P 450 被再生成它的 Fe<sup>3+</sup>型。在一些细胞中, 有一种铁-硫蛋白主持从 FADH<sub>2</sub> 向 P 450 转移电子。

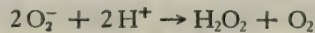
肝脏微粒体可以催化许多不同种类底物的羟化, 包括类固醇、脂肪酸、鲨烯和某些氨基酸。它们也促进各种药物的羟化, 例如苯巴比妥、吗啡、可待因、苯异丙胺, 以及像甲基胆蒎那样的致癌烃。这些正常出现的异物的羟化是它们代谢的一个步骤。黄素蛋白和 P 450 是可诱导的, 即如给动物以巴比妥盐和其它药物, 则其肝内这两者的浓度将大为增加。事实上, 这些制剂可刺激肝脏滑面内质网的增生, 推测它属于一种防卫性或保护性适应作用。

肝脏微粒体还具有第二种类型的非磷酸化电子传递链, 它包括黄素蛋白、细胞色素 b<sub>5</sub> 还原酶和细胞色素 b<sub>5</sub>。这是在内质网而不是在线粒体内膜上发现的一种细胞色素。这两种蛋白已高度提纯并详加研究。在脂肪酸的去饱和反应中, 微粒体的这类电子传递链显得特别活跃。

## 超氧化物歧化酶和过氧化氢酶

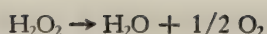
当电子经线粒体呼吸链传递到分子氧以及在各种羟化和氧合反应时, 推测会形成有毒性的氧的部分还原产物, 作为过渡性中间产物而出现在这些酶的活性部位上。其中最重要的是超氧化物阴离子 O<sub>2</sub><sup>-</sup> (见前面内容) 和过氧化氢, 它们具有极强的反应力, 从而给各种生物分子带来不可逆的损害。

主要通过 Fridovich 及其同事的研究工作, 我们发现需氧细胞通常含有超氧化物歧化酶, 它可将超氧化物转变成过氧化氢和分子氧:



又发现有两种形式的超氧化物歧化酶, 一种在线粒体外的胞汁内, 另一种则在线粒体内。就其特有的 Mn<sup>2+</sup> 含量和许多相同的氨基酸顺序而言, 真核生物线粒体的超氧化物歧化酶与许多细菌的超氧化物歧化酶是相似的。另一方面, 胞汁型的超氧歧化酶在结构上完全不同, 并含有 Cu<sup>2+</sup> 和 Zn<sup>2+</sup>。这些酶以很高的浓度存在, 而且非常活跃。这点提示, 当各种酶和酶系统对氧进行酶促还原时, 有超氧化物根的不断生成和迅速移除。

超氧化物歧化酶和需要黄素的氧化酶所形成的过氧化氢, 可以在下列反应中被血红素酶——过氧化氢酶分解:



过氧化氢酶存在于动物细胞的微体中,也称为过氧化物酶体。

抗坏血酸、谷胱甘肽和维生素 E 或许会加强超氧化物歧化酶和过氧化氢酶的保护作用。这是因为它们容易接受电子,并通过清除游离基而发挥其支持功能。

## 将氧化-还原能量转化成生物发光

发光的生物包括某些细菌、原生动物、真菌、蠕虫和甲壳类动物,特别是萤火虫。在许多这些生物发生了酶促氧化还原反应,而反应的自由能变化可用来激发一个分子使之达到高能状态。随后,被激发的分子又恢复到基态,而这又是一个伴有可见光发射的过程。这种现象称为生物发光。

McElroy 及其同事曾研究过萤火虫发光的分子组分和作用机制。有两种必需的组分已从萤火虫提出并制得结晶:一种是对热稳定的杂环族酚,即虫萤光素(图 18-21);而另一种是对热不稳定的酶,虫萤光素酶。虫萤光素酶(分子量约为 100,000)似无辅基。在第一步,虫萤光素( $\text{LH}_2$ )和 ATP 起反应,以形成虫萤光素腺苷酸( $\text{LH}_2\text{-AMP}$ ),后者仍紧密地结合在虫萤光素酶的催化部位上:

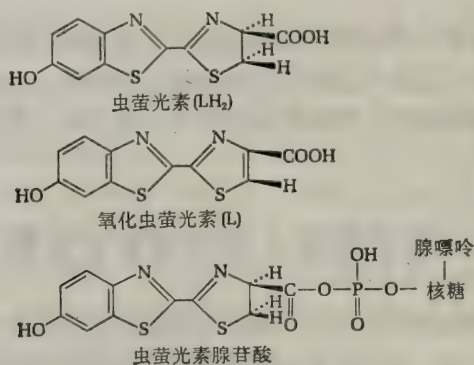
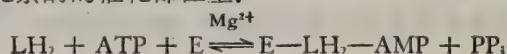


图 18-21 虫萤光素酶反应的组分

当酶的这种形式暴露在分子氧中时,与酶结合的虫萤光素腺苷酸将被氧化,产生了氧化虫萤光素(L),当 L 回到基态时即发光:



每分子虫萤光素被氧化后,放出一个光子。推测此时形成了中间产物——一种过氧化物。发射光的颜色取决于酶蛋白,因为不同种属的萤火虫虽含有相同的虫萤光素,但却发出不同颜色的光。这一种不寻常的能量转化显然已成为萤火虫交配的信号。以记录光度计追踪虫萤光素-虫萤光素酶反应,常用于 ATP 的高敏感定量分析。

## 摘 要

在氧化还原反应中,电子从还原剂或电子供体传递到氧化剂或电子受体。任何生物



还原剂供给电子的倾向是由标准氧还电位  $E'_0$  测知的。该电位是指在 25°C 和 pH7.0 并有 1.0 M 氧化剂存在时, 1.0 M 还原剂在一个惰性电极处所产生的电动势。从任何一个已知的共轭氧还对的  $E'_0$  值能预测它与另一氧还对起反应时其净电子流的方向。

有四类主要的氧化还原酶: (1) 需要吡啶的脱氢酶类, 可催化电子从底物可逆地转移到疏松结合的辅酶  $\text{NAD}^+$  或  $\text{NADP}^+$  上, 分别生成  $\text{NADH}$  和  $\text{NADPH}$ 。  $\text{NAD}^+$  或  $\text{NADP}^+$  的吡啶环的酶促还原, 常伴有光谱变化, 而且有立体结构特异性。(2) 需要黄素的脱氢酶类, 含有紧密结合的 FMN 或 FAD 作为辅基, 并常有一个金属离子。它们的氧化型颜色很深, 当完全还原时则无色。最重要的黄素脱氢酶类有琥珀酸脱氢酶和  $\text{NADH}$  脱氢酶。(3) 铁-硫蛋白类, 含有 2—8 个铁原子和数目相等的对酸不稳定的硫原子; 铁原子能进行  $\text{Fe(II)}-\text{Fe(III)}$  的转变。(4) 细胞色素类, 可连续地将电子从黄素蛋白类传到氧。它们含有铁-卟啉辅基, 且能进行  $\text{Fe(II)}-\text{Fe(III)}$  的可逆性转变, 这种转变可用分光光度法追踪。

线粒体的呼吸链是由后列顺序的传递组成, 即  $\text{NADH}$ 、 $\text{NADH}$  脱氢酶, 铁-硫蛋白, 泛醌和细胞色素  $\text{b}$ 、 $\text{c}_1$ 、 $\text{c}$ 、 $\text{a}$  和  $\text{a}_3$ 。一些其它的铁硫核心或蛋白质也可参加。沿着这条链的电子传递, 可特异地被鱼藤酮、抗霉素 A 和氰化物等在一些特定的点上抑制。分光光度法观察, 可用于电子传递体顺序的研究。某些电子传递反应, 伴有  $\text{H}^+$  的获得或形成。当电子从  $\text{NADH}$  传到氧时, 其自由能降低极多, 此自由能可通过 ADP 的偶联磷酸化以生成 ATP 而部分地贮存起来。

电子传递链也可出现于细菌的细胞膜、叶绿体和细胞核内。分子氧也能用于各种不同的有机代谢物的羟化。二加氧酶使  $\text{O}_2$  的两个氧原子插入底物, 而单加氧酶则只使一个氧原子插入。内质网的特殊电子传递链含有细胞色素 P 450 或细胞色素  $\text{b}_5$ , 该链在许多酶促羟化反应中也很活跃。

## 参 考 文 献

书籍 也可参阅第十九章文献

- Estabrook, R. W., and M. E. Pullman (eds.): *Oxidation and Phosphorylation*, vol. 10, *Methods in Enzymology*, Academic, New York, 1967. Experimental methods.
- Hayaishi, O. (ed.): *Oxygenases*, Academic, New York, 1972. A collection of reviews.
- Keilin, D.: *The History of Cell Respiration and Cytochromes*, Cambridge University Press, New York, 1966.
- King, T. E., and M. Klingenberg (eds.): *Electron and Coupled Energy Transfer in Biological System*, vols. I and II, Dekker, New York, 1971. Reviews on various aspects of electron transport and electron carriers.
- Lehninger, A. L.: *The Mitochondrion: Molecular Basis of Structure and Function*, Benjamin, Menlo Park, Calif., 1964. Traces the development of current knowledge.
- Lemberg, R., and J. Barrett: *Cytochromes*, Academic, New York, 1973. Comprehensive treatise with complete bibliography.
- Lovenberg, W. (ed.): *Iron-Sulfur Proteins*, vols. 1 and 2, Academic, New York, 1973. Reviews on the chemistry and biochemistry of these proteins, including the iron-sulfur flavoproteins.
- Sund, H. (ed.): *Pyridine Nucleotide Dependent Dehydrogenases*, Springer-Verlag, New York, 1970. A collection of papers.
- Wainio, W. W.: *The Mammalian Respiratory Chain* Academic, New York, 1970.

论文

- Chance, B., and G. R. Williams: "The Respiratory Chain and Oxidative Phosphorylation," *Adv. Enzymol.*, 17: 65 (1956). An early review of the dynamics of the electron-transport chain.
- Everse, J., and N. O. Kaplan: "Lactate Dehydrogenase: Structure and Function," *Adv. Enzymol.*, 37: 61—134 (1973).

- Fridovich, I.: "Superoxide Dismutases," *Adv. Enzymol.*, 41: 35—97 (1974).
- Hemmerich, P., G. Nagelschneider, and C. Veeger: "Chemistry and Biology of Flavins and Flavoproteins," *FEBS Lett.*, 8: 69—83 (1970).
- Kaplan, N. O.: "Pyridine Nucleotide Transhydrogenases," pp. 105—133, in *The Harvey Lectures*, ser. 66, Academic, New York, 1972.
- Klingenberg, M.: "The Respiratory Chain," p. 3 in T. P. Singer (ed.), *Biological Oxidations*, Wiley-Interscience, New York, 1968.
- Kroger, A., V. Didak, M. Klingenberg, and F. Diemer: "On the Role of Quinones in Bacterial Electron Transport," *Eur. J. Biochem.*, 21: 322—333 (1971).
- Lee, C.-Y., R. D. Eichner, and N. O. Kaplan: "Conformation of Diphosphopyridine Coenzymes on Binding to Dehydrogenases," *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.)*, 70: 1593—1597 (1973).
- Mccapra, F.: "The Chemistry of Bioluminescence," *Endeavour*, 39: 139—145 (1973).
- Ohnishi, T.: "Mechanisms of Electron Transport and Energy Conservation in the Site I Region," *Biochim. Biophys. Acta*, 301: 105—128 (1973).
- Orme-johnson, W. H.: "Iron-Sulfur Proteins," *Ann. Rev. Biochem.*, 42: 159—204 (1973).
- Singer, T. P., and M. Gutman: "The DPNH Dehydrogenase of the Mitochondrial Respiratory Chain," *Adv. Enzymol.*, 34: 79—153 (1971).
- Singer, T. P., E. B. Kearney, and W. C. Kenney: "Succinate Dehydrogenase," *Adv. Enzymol.*, 37: 184—272 (1973).
- Wilson, D. F., P. L. Dutton, and M. Wagner: "Energy-Transducing Components in Mitochondrial Respiration," p. 234 in D. R. Sanadi and L. Packer (eds.), *Current Topics in Bioenergetics*, vol. 5, Academic, New York, 1973. Detailed treatment of the oxidation-reduction potentials of the members of the electrontransport chain.

## 习 题

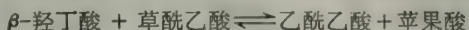
- 有一个感应电极, 在 pH 7.0、温度 25°C 和带有电位为 0.00 伏的参比半电池的条件下, 浸泡在含有 NAD 和 NADH 的下列混合溶液中, 试计算该电极所记录的电动势的伏特数:
  - 1.0 mM NAD<sup>+</sup> 和 10 mM NADH
  - 1.0 mM NAD<sup>+</sup> 和 1.0 mM NADH
  - 10 mM NAD<sup>+</sup> 和 1.0 mM NADH
- 按供电子的递增趋势的顺序, 记录后列物质: (a) 细胞色素 C<sub>还原型</sub>, (b) NADH, (c) H<sub>2</sub>, (d) 泛醇, (e) 乳酸。
- 按接受电子的递增趋势的顺序, 记录后列物质: (a) α-酮戊二酸 + CO<sub>2</sub>, (b) 草酰乙酸, (c) O<sub>2</sub>, (d) NADP<sup>+</sup>。
- 假设有适当的酶进行催化, 在标准状况下, 下列那一反应将按所示方向进行?
  - 苹果酸 + NAD<sup>+</sup> → 草酰乙酸 + NADH + H<sup>+</sup>
  - 乙酰乙酸 + NADH + H<sup>+</sup> → β-羟丁酸 + NAD<sup>+</sup>
  - 丙酮酸 + NADH + H<sup>+</sup> → 乳酸 + NAD<sup>+</sup>
  - 丙酮酸 + β-羟丁酸 → 乳酸 + 乙酰乙酸
  - 苹果酸 + 丙酮酸 → 草酰乙酸 + 乳酸
  - 乙醛 + 琥珀酸 → 乙酸 + 延胡索酸
- 当一对电子当量经过下列物质时, 试计算其标准自由能的变化: (a) 从异柠檬酸到 NAD<sup>+</sup>, (b) 从琥珀酸到细胞色素 b, (c) 从苹果酸到 NAD<sup>+</sup>, (d) 从 NADH 到细胞色素 c (假设在 pH 7.0 和温度 25°C)。
- 从标准氧还电位开始, 计算在 25°C 和 pH 7.0 时下列反应的平衡常数:
  - 苹果酸 + NAD<sup>+</sup> ⇌ 草酰乙酸 + NADH + H<sup>+</sup>
  - 乙酰乙酸 + NADH + H<sup>+</sup> ⇌ β-羟丁酸 + NAD<sup>+</sup>
- 试计算反应式中苹果酸、草酰乙酸、NAD<sup>+</sup> 和 NADH 的平衡浓度:





当反应在 pH 7.0 和 25°C 完成时,每一组分的最初浓度是 10 mM。

8. 试计算在下列总反应中,苹果酸和草酰乙酸的平衡浓度:



在 NAD 存在下,此反应经需要 NAD 的  $\beta$ -羟丁酸脱氢酶和苹果酸脱氢酶催化。假设反应发生在 25°C 和 pH 7.0,  $\beta$ -羟丁酸和乙酰乙酸的初浓度为 10 mM,而草酰乙酸和苹果酸的初浓度为 20 mM。

9. 用标准电位计算后列物质将琥珀酸氧化为延胡索酸时其标准自由能的变化: (a) 如在细胞内通过一种黄素蛋白, (b) 通过  $\text{NAD}^+$ 。

10. 在肾脏内,通过需要吡啶核苷酸的混合功能氧化酶的催化,可使 25-羟胆钙化醇 (25-羟维生素  $\text{D}_3$ ) 变成 1, 25-二羟胆钙化醇。试写出该反应的平衡方程式。

11. 于酵母醇脱氢酶和 NAD 存在下,将二氘化乙醇 ( $\text{CH}_3\text{CD}_2\text{OH}$ ) 氧化。在需要 NADH 的某种特异性脱氢酶的催化下,使得到的还原型吡啶核苷酸再与底物 A 保温。特殊的还原型化合物  $\text{AH}_2$  不含有氘,而每分子的  $\text{NAD}^+$  含有一个氘原子。试问脱氢酶可能是从 NADH 的 A 侧还是 B 侧传递氢到底物 A?

12. 下列典型的脱氢酶反应有一个吡啶核苷酸参加:



试考虑: (a) 在不同的 NAD(P) 时将  $1/V_0$  对  $1/[\text{AH}_2]$  绘图,将得到什么模式图? (b) 在  $\text{NAD}^+$  和 NADH 之间将以什么动力学关系为主? (见第八章)。

13. 在肝线粒体内,充分供给异柠檬酸作底物,佐以大量  $\text{P}_i$ 、ADP 和氧,但以 (a) 鱼藤酮, (b) 抗霉素 A 和 (c) 氰化物引起抑制。试预测此体系中 NAD、NADH 脱氢酶、细胞色素 b、细胞色素 c 和细胞色素 a 的氧化状态。

[马传桃译 卢义钦校]

## 第十九章 氧化磷酸化、线粒体结构和呼吸代谢的分隔现象

在前一章中,我们讨论了呼吸链的组成和电子从有机底物传递到氧的过程。我们现在来讨论氧化磷酸化,即电子沿呼吸链传递,并与 ATP 的高能磷酸基的形成相偶联同时半随自由能降低的机制。氧化磷酸化对需氧生物的细胞生命在各方面都是必需的,因为这是它们有用能量的主要来源。这也是引起特别注意的研究课题,问题的最终解决将取决于对线粒体内膜分子结构的详细了解,那里是这一重要换能系统的所在部位。因此,我们的讨论要从线粒体的结构开始。

在本章中,我们还将知道线粒体膜含有许多运输系统,它们促进某些代谢物 and 无机离子在线粒体基质和周围胞液汁之间的运输,这些运输系统是隔室内的一些成分而且调节能量代谢;它们还参与其它重要的代谢活动。

### 线粒体的结构

每个细胞中线粒体的数目是相对恒定的,并且是各型细胞的特征。例如,大白鼠的一个肝细胞约含有 800 个线粒体(见图 1-8)。因为线粒体生化活动的主要产物是 ATP,所以线粒体往往位于需要 ATP (即它们生物化学活动的主要产物)的结构附近,或者位于它们所需燃料来源的附近。例如,某些昆虫飞翔肌细胞中的线粒体有规律地沿肌原纤维排列,因此这些线粒体所生成的 ATP 只须经短距离扩散就可到达需要 ATP 供能的收缩单位。线粒体也往往位于细胞质中作为氧化时燃料来源的脂肪微粒的附近。线粒体在细胞质中所占体积相当大,在肝细胞中约占 20%,在心肌细胞中约占 50% 以上。

在棕色脂肪细胞,线粒体为球形或近于球形;在肝细胞为橄榄形;在肾细胞为圆柱形;在成纤维细胞则为线形;有时它们有很复杂而且不规则的结构,如在酵母细胞中,具有延伸的隆起。研究最广泛的线粒体是大白鼠肝细胞的线粒体,电子显微镜观察表明,在完整的细胞中线粒体长约 2 微米,宽不及 1 微米(图 19-1)。因此它们的大小约与细菌相当。

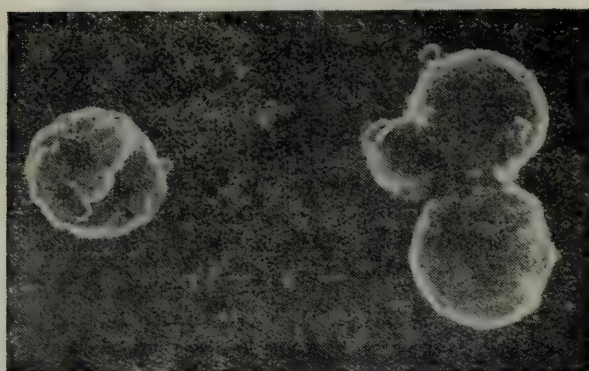
线粒体具有两层膜(图 19-1),外膜是平滑的,并且有一定的弹性;内膜有向内缩回的折叠叫做嵴。不同类型的细胞,其嵴的数目和结构也不相同(图 19-2)。对线粒体的体积而言,嵴的存在似乎是增加内膜表面积的装置。

内膜隔室里面有基质。这一胶质样的相约含 50% 蛋白质,其中有些组成网状结构并粘附在内膜的内表面上。在呼吸活动改变时,基质的体积和组织状态发生明显变化。基质还含有 DNA 和核糖体,核糖体经常在内膜与外膜非常接近的部位的附近。

用负对比染色法(negative-contrast staining)发现线粒体内膜和外膜的超微结构不同(图 19-3)。H. Fernández-Morán 用负对比染色法证明内膜的内表面为间隔规则的球形颗粒(直径 8.0—9.0 毫微米)所覆盖(图 19-3),这些颗粒通过狭柄与内膜相连,这些象门把手样的结构早时称为基本颗粒(elementary particle),而现在称之为内膜球粒(inner-memb-

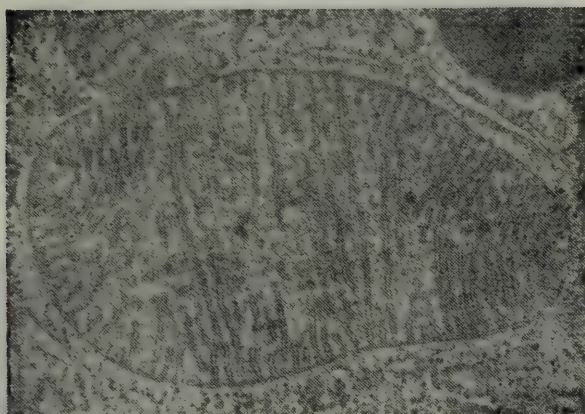


离体状态的完整肝线粒体的扫描电子显微镜照片



1.0 微米

蝙蝠胰脏细胞线粒体薄片的电子显微镜照片



0.5 微米

表示膜的三维排列的心脏线粒体示意图

(摘自 Peter Raven and Helena curtis, Biology of Plants, Worth Publishers, Inc., New York, 1970)

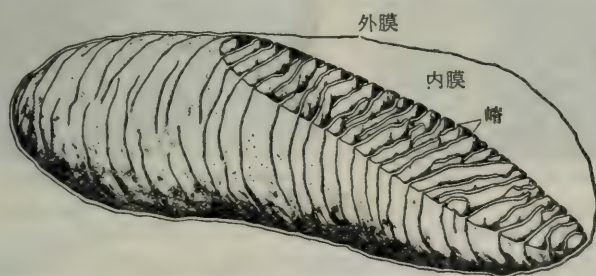


图 19-1 线粒体的结构

ane sphere)。在内膜的外表面及外膜的任何一面都不含内膜球粒。

## 线粒体内酶的定位

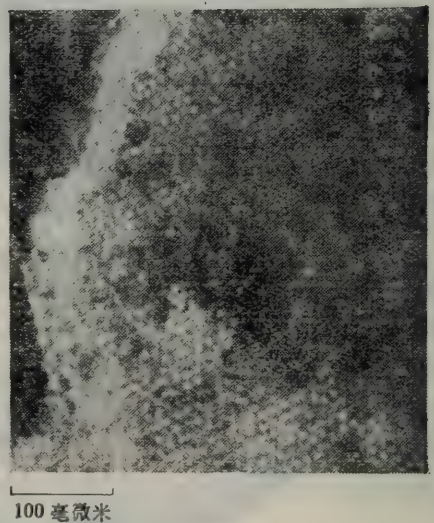
肝线粒体的外膜可以移去，留下的含有完整内膜和基质的线粒体结构称为线粒质体



图 19-2 各型细胞线粒体中嵴的结构变化



苍蝇飞翔肌中一个嵴的边的轮廓

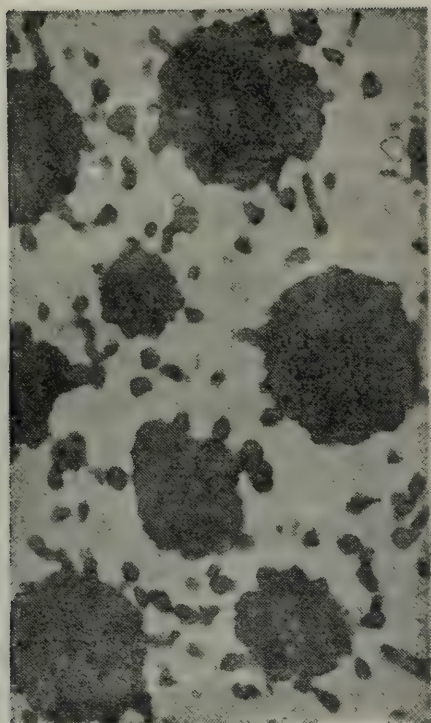


内膜的内表面

图 19-3 用负对比染色后, 嵴上内膜球粒的电子显微镜照片。此法是将破碎的线粒体与磷钨酸溶液混合、干燥, 在电子显微镜下观察, 因为磷钨酸是不透过电子的, 排列在膜结构的周围, 突出了膜的轮廓。

(mitoplast) (图 19-4)。用中性去污剂 (如 Lubrol) 可从此种制备中将基质内容物抽提出来。已经分析了外膜、内膜和基质的分子组成和酶含量 (表 19-1)。内膜含细胞色素 b、c、 $c_1$ 、a 和  $a_3$ 、与氧化磷酸化机制有关的  $F_1$  ATP 酶、某些脱氢酶 (特别是琥珀酸脱氢酶和 NADH 脱氢酶)。外膜不含任何这些成分, 但含有内膜所不含的特异酶, 最明显的是单胺氧化酶 (一种催化各种单胺, 如肾上腺素, 氧化的黄素蛋白)。单胺氧化酶是用作表示外





1.0 微米

图 19-4 除去外膜的大白鼠肝线粒体（线粒质体）。突出来的结构可能是翻出来的嵴。

膜存在的一种“标志酶”。同样，细胞色素  $a$  和  $a_3$  在细胞的其他部分没有发现，可作为内膜的标志。基质的特征是含有大部分参与三羧酸循环的酶。苹果酸脱氢酶和谷氨酸脱氢酶往往用作线粒体基质的标志。

表 19-1 大白鼠肝线粒体内某些酶的定位

外膜	基质
单胺氧化酶	柠檬酸合成酶
犬尿酸-3-加单氧酶	异柠檬酸脱氢酶
对抗霉素不敏感的 NADH 脱氢酶	延胡索酸酶
脂酰辅酶 A 合成酶	苹果酸脱氢酶
磷脂酶 $A_2$	谷氨酸脱氢酶
二磷酸核苷激酶	天冬氨酸转氨酶
内、外膜的间隙	脂酰辅酶 A 氧化酶类(第二十章)
腺苷酸激酶	
内膜	
对抗霉素敏感的 NADH 脱氢酶	
铁-硫蛋白	
细胞色素 $b$ 、 $c$ 、 $c_1$ 、 $a$ 和 $a_3$	
$F_1$ ATP 酶	
琥珀酸脱氢酶	
D- $\beta$ -羟丁酸脱氢酶	
肉毒碱脂酰转移酶	

肝线粒体外膜中类脂的含量近 50%，而内膜显然不同，仅含 20% 的类脂，约 80% 的蛋白质。内膜的特点是富含心磷脂（cardiolipin），约占内膜类脂的 20%。

内外膜之间的间隙也含有特殊的酶，特别是腺苷酸激酶。某些酶已能比较精确地定位，例如心肌线粒体的肌酸激酶位于内膜的外表面。

## 内膜的结构组成

肝线粒体的内膜至少含有 60 种不同的生物活性蛋白质，嵌入磷脂双层系统之中。其中包括传递电子的酶类和蛋白质类，与 ATP 合成有关的酶类、各种脱氢酶、各种代谢物运输系统的蛋白质成分。其中多数蛋白质很难从完整的具有功能的膜结构中提取出来。电子传递与磷酸化系统的蛋白质与膜的非极性脂质紧密结合，以致给氧化磷酸化酶机制的研究带来极大的困难。

用电子显微镜的冰冻蚀刻法（freeze-etch）提供了有关内膜结构的有价值的资料。用这个方法发现内膜的表面具有许多相当于酶分子位置的凹凸处（图 9-5）。线粒体内膜的结构模式如图 19-6 所示。以后我们还将看到许多内膜的酶和细胞色素在膜上具有固定的侧边，不能旋转。

分光光度法研究表明，不同细胞的线粒体的细胞色素、黄素蛋白和铁-硫蛋白的分子比例明显不同。表 19-2 列举了牛心线粒体电子载体的分子比例。有些电子载体组成超分

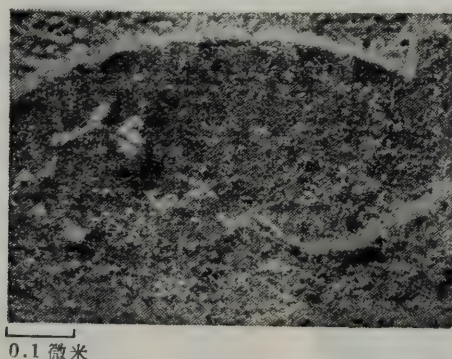


图 19-5 进行了冰冻蚀刻的大鼠肝线粒体的外膜中心内凹碎片（单箭头处）和内膜（双箭头处）的电子显微镜照片。本法采用快速冰冻，然后用锋利的刀片将每层膜劈成二小叶。外膜的分子中心有小颗粒呈六角形排列，可能是蛋白质分子。内膜中心的大分子颗粒是电子传递蛋白质以及与氧化、磷酸化和运输有关的酶类的簇团。[引自 C. R. Hackenbrock *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 195: 499 (1972)]



图 19-6 线粒体内膜模式图（侧面观）

钉子状结构表示磷脂分子，球状结构是按比例画出的蛋白质分子。结构单位没有有规则的重复。内膜约含 80% 的蛋白质，包括许多不同的酶和运输系统，仅含 20% 类脂。[引自：F. S. Sjöstrand and L. Barajas, *J. Ultrastructure Res.*, 32: 298, (1970)]



子复合物(可从膜上作为一个单位分离出来)的形式存在。这种复合物之一含有 NADH 脱氢酶、四个或更多的铁-硫中心和许多类脂,另一复合物含细胞色素 b 和  $c_1$ ,而细胞色素 a 和  $a_3$  则又形成另一种复合物。这些复合物相互间的比例随细胞类型不同而不同。

表 19-2 牛心线粒体呼吸链中某些电子传递组分的分子比例

组 分	分子比例(以细胞色素 a = 1.0 计算)
NADH + NAD <sup>+</sup>	9
NADH 脱氢酶	0.14
泛醌	7
细胞色素 b	1.1
细胞色素 $c_1$ + c	1.2
细胞色素 a	1.0
细胞色素 $a_3$	1.1

在单位面积的内膜中细胞色素 a 的分子数(即具有功能的呼吸链数目)在种属与种属之间是恒定的。肝线粒体的嵴较稀疏,内膜面积相对地小,呼吸速率也相对地低,约含 17,000 分子细胞色素 a,但心线粒体含大量的嵴,呼吸速率较高,含有 60,000 至 70,000 分子细胞色素 a。内膜的表面积看来和组织的呼吸强度有关系。苍蝇飞翔肌的线粒体特别大,它是已知的呼吸最强的组织之一。这些线粒体具有巨大的内膜面积,达到每克线粒体蛋白质约 400 平方米。

### 氧化磷酸化作用

我们现在来讨论呼吸链中能量偶联的过程,这过程消耗电子转移到氧所产生的能量,同时由 ADP 和磷酸生成 ATP。

动物组织中磷酸化作用与呼吸偶联的设想是在三十年代早期由苏联的 V. A. Engelhardt 首先提出的。但是直到 1937 年三羧酸循环被确定之后,才得到可靠的证实。H. Kalkar 在丹麦, V. Belitser 在苏联分别报导:三羧酸循环的各种中间产物能被新鲜杀死的动物肝、肾或肌肉组织的缓冲悬浮液所氧化,而介质中的无机磷消失。同时有机磷酸化合物,如 6-磷酸葡萄糖、6-磷酸果糖的浓度增加,它们的磷酸根则来自 ATP。如果不供给组织悬浮液以氧气或用氰化物毒害之,无机磷就不被摄取了。因此证明,与有氧呼吸偶联的磷酸化作用是一种回收能量的机制。

几年后见到的报道更为定量些。据认为,每消耗一个氧原子时,自 ADP 生成的 ATP 还不只一个分子, P/O 比值(即每消耗一个氧原子时,ADP 磷酸化所需摄取的无机磷酸分子数)已被确定:丙酮酸经三羧酸循环氧化时包括的 5 个氧化步骤的每个步骤的 P/O 比值平均为 3。(表 19-3)

早期已认识到氧化磷酸化是一种极不稳定的过程,在比较新鲜的、未经部分分离的组织悬液中活性最强,在陈旧的制剂或组织的可溶性提取物中则不发生此过程。而且氧化磷酸化对介质的渗透压是敏感的,表明它只在有膜包围的细胞器中进行。1948 年, E. P. Kennedy 和 A. L. Lehninger 发现这种行为的理由:他们证明氧化磷酸化作用仅发生于

表 19-3 三羧酸循环中各氧化步骤的 P/O 比值

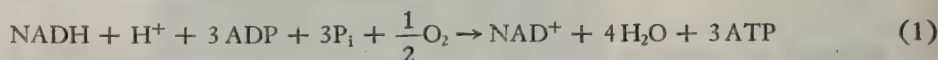
步 骤	P/O 比值
丙酮酸 → 乙酰辅酶 A	3
异柠檬酸 → $\alpha$ -酮戊二酸	3
$\alpha$ -酮戊二酸 → 琥珀酰辅酶 A	3
琥珀酸 → 延胡索酸	2
苹果酸 → 草酰醋酸	3

用差速离心法从大白鼠肝匀浆中分得的线粒体部分。其后,发现所检查过的各种属和各类型细胞的氧化磷酸化均发生在线粒体部分。

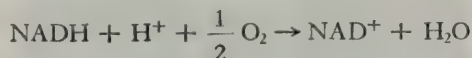
### 氧化磷酸化作用与电子传递的偶联

1949—1951 年 Lehninger 提供实验证据,证明电子从 NADH 传递到氧所产生的能量是 ADP 偶联磷酸化能量的直接来源。将用水处理过的线粒体、磷酸盐、ADP 和纯的 NADH 在通氧的情况下保温,不加三羧酸循环的中间产物或任何其他有机的代谢物(必须用低渗水处理线粒体以便 NADH 能进入线粒体)。在消耗氧分子时, NADH 迅速被氧化成  $\text{NAD}^+$ , 同时从 ADP 和磷酸形成 3 分子 ATP。这些实验表明,从 NADH 到氧的电子传递链中有三个点可使氧化还原能量转变成磷酸键能。由于这个道理,氧化磷酸化作用可更准确地称之为呼吸链磷酸化作用。

因而,呼吸链磷酸化的总方程式可以写为:

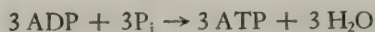


反应方程式可分成外源性部分,



$$\Delta G^{\circ'} = -52.7 \text{ 千卡/克分子}$$

和内源性部分,



$$\Delta G^{\circ'} = 3 \times 7.3 = +21.9 \text{ 千卡/克分子}$$

因此,在标准情况下,一对电子从 NADH 传递到氧时,偶联磷酸化作用生成的 3 分子 ATP 贮能  $21.9/52.7 \times 100$ ,或者说总自由能降低 42%。

呼吸链中三个产能的部位也已经确定。它们是从计算呼吸链的连续电子传递步骤的每一步中转移一对电子当量时的自由能变化而测出的。这种计算是用前章所叙述的关系式:

$$\Delta G = -nF\Delta E'$$

以及用表 18-1 和 18-4 所列的标准氧化还原电位差算出。图 19-7 表示呼吸链中有三处地方自由能降低较多,每处提供的能量(至少在理论上)足以使 ADP 和磷酸形成 ATP。当然这种计算是基于假设热力学平衡,在完整细胞里任何这种步骤都不需要热力学平衡



存在,而且各种组分的标准浓度为 1.0 M 也是一种不大可能的情况。然而用直接的实验方法对呼吸链的特殊部分形成 ATP 的能力测试过,证明呼吸链的这三段是真正的能量偶联部位。它们被称之为部位 I (NADH 和辅酶 Q 中间的一段)、部位 II (细胞色素 b 和 c 之间的一段)和部位 III (细胞色素 a 和氧之间的一段)。因此可以认为多成员的呼吸链是一种能被断开成一系列能降较小的装置,而不是当一对电子从 NADH ( $E'_0 = -0.32$  伏)传递至分子氧 ( $E'_0 = +0.82$  伏)时 (即指每个氧原子被还原时产生 52.7 千卡自由能的过程)发生较大的自由能降低。这三个部位产生的能量足以使 ADP 和磷酸盐产生一分子 ATP。因此可以认为呼吸链是一种能量转换器。

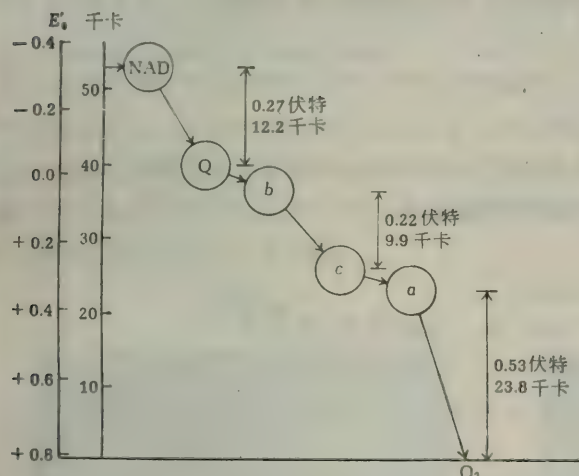


图 19-7 电子对通过呼吸链传递到氧时自由能的降低。用箭头标明的三个部位,是产能部位,其中每一部位产生的能量足以使 ADP 和磷酸产生一分子 ATP。

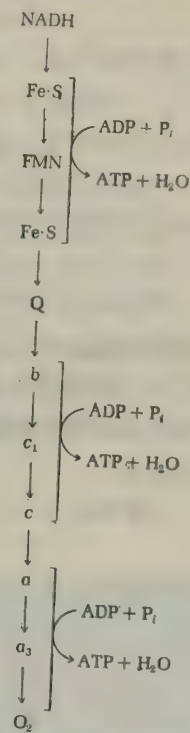
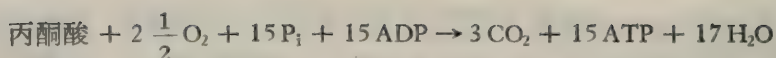


图 19-8 呼吸链中能量贮存的可能部位

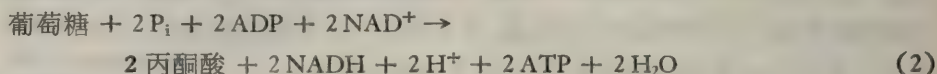
我们从图 19-8 中可以看出,许多与 NAD 相连的底物 (不仅是三羧酸循环中的物质) 在线粒体氧化时,每还原一个氧原子可以生成 3 分子 ATP ( $P/O$  比值 = 3.0)。但是某些代谢物,如琥珀酸、各种脂酰辅酶 A 和磷酸甘油等绕过部位 I 而由黄素蛋白催化脱氢,将电子直接交给泛醌 (图 18-14)。因此每还原一个氧原子只形成 2 分子 ATP (在部位 II 和 III) ( $P/O$  比值 = 2.0)。

### 葡萄糖氧化的能量平衡图

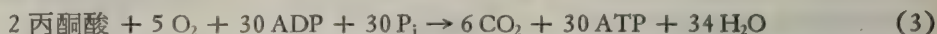
从表 19-3 的数据我们可以看到,每分子丙酮酸完全氧化时,在四个与 NAD 相连的步骤,即丙酮酸、异柠檬酸、 $\alpha$ -酮戊二酸和苹果酸氧化时,生成 12 分子 ATP;琥珀酸在与黄素相连的氧化过程中形成 2 分子 ATP;在消耗琥珀酰辅酶 A 的情况下由于底物水平磷酸化生成 1 分子 ATP;所以每氧化 1 分子丙酮酸总共产生 15 分子 ATP。因此,我们可以写出丙酮酸被线粒体完全氧化 (包括偶联的磷酸化作用) 时的方程式:



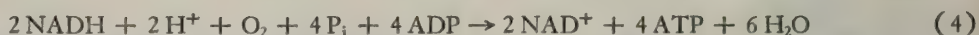
现在我们可以写出一组关于葡萄糖完全氧化成  $\text{CO}_2$  和  $\text{H}_2\text{O}$  而自由能以 ATP 的形式贮存的方程式。至于糖酵解产生丙酮酸,我们用下面的方程式表示:



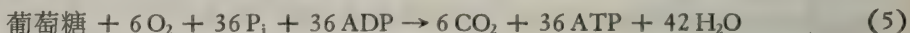
三羧酸循环的方程式为:



我们还必须加入葡萄糖在线粒体外经酵解转变成丙酮酸时所生成的 2 分子 NADH 的氧化方程式,线粒体外 NADH 氧化,每对电子可产生 2 分子或 3 分子 ATP,这取决于线粒体外 NADH 的电子怎样进入线粒体内。我们如果假设此过程中生成 2 分子 ATP,则:

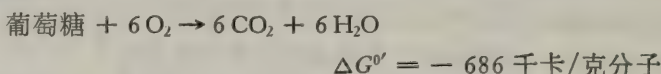


合并方程式 (2)、(3) 和 (4), 则得

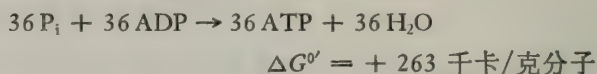


如果我们现在将此总方程式分解成能量反应,则

外源部分:



内源部分:



在标准条件下葡萄糖完全氧化时能量回收的总效率为  $263/686 \times 100 = 38\%$ , 然而,在细胞内的条件下,真正的效率高得多。

## 电子传递速率的受体调节

呼吸链磷酸化的总方程式[方程式 (1)] 表明,磷酸盐和 ADP 是电子从 NADH 传递到氧的过程中必需的反应物。事实上,只有当悬浮介质中有磷酸和 ADP 存在时,电子才能以最大速率在完整线粒体内进行传递。如果缺乏 ADP,呼吸速率就很低,不出现磷酸化,因为没有磷酸受体。这种情况称为呼吸状态 4,即呼吸的停顿或静息态(图 19-9)。若向此系统加入已知量的 ADP,耗氧量急剧增至最大,同时所加 ADP 因磷酸化而变成 ATP,此称为状态 3,或活跃的呼吸状态。当加入的 ADP 全部磷酸化以后,氧的消耗速率骤然回降到静息状态(状态 4)(图 19-9)。这种由 ADP 浓度控制电子传递速率的现象叫做受体调节,或不准确地称之为呼吸调节。完整的线粒体对 ADP 有很高的亲和力,在其他必需物质都存在时,线粒体可使 ADP 不停地磷酸化,直到 ADP 的浓度降得很低时为止。受体调节比值或指数是指在足够的 ADP 存在时,线粒体的呼吸速率与无 ADP 存在时的呼吸速率之比。正常时这个比值很高,在完整线粒体,此比值为 10 或 10 以上,而在完整的细胞甚至更高。但是,当线粒体被损坏或老化时,它们便失去使 ADP 磷酸化的能力,比



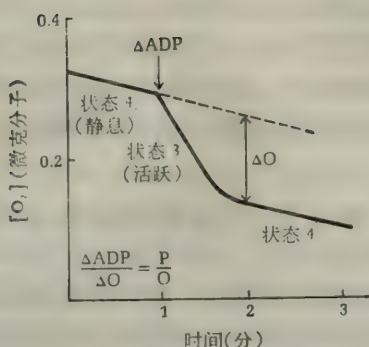


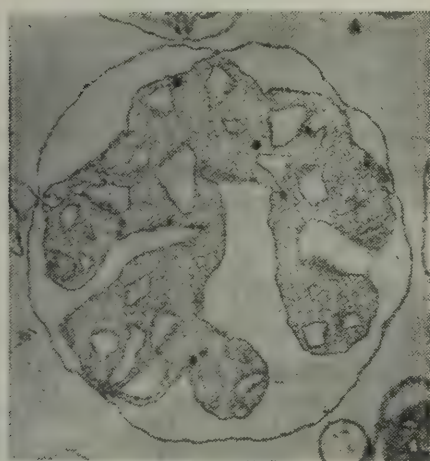
图 19-9 呼吸作用的受体调节

在呼吸状态 4, 所有可用的 ADP 都被磷酸化成 ATP, 此系统是静息的, 当加入 ADP ( $\Delta ADP$ ) 时, 氧耗急剧增加至状态 3 或活跃状态的速率, 此时加入的 ADP 被磷酸化而成 ATP。当 ADP 接近全部被磷酸化时, 线粒体回复到状态 4。加入的 ADP 分子数与额外消耗的氧原子数之比值 ( $\Delta ADP/O$ ) 等于 P/O 比值, 呼吸状态 3 的速率与呼吸状态 4 的速率之比就是受体(或呼吸)调节比值。

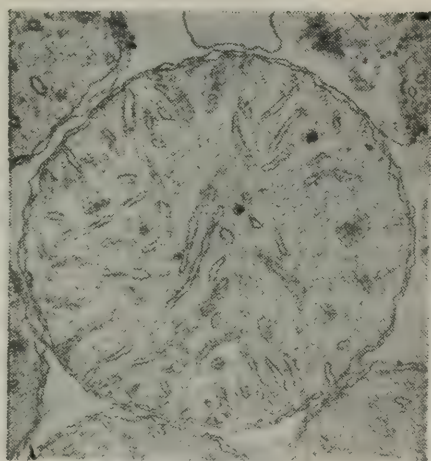
值下降到 1.0。在这种受损的线粒体, 当无 ADP 存在时, 电子可以最大速率进行传递。受体调节比值对测定分离线粒体的整合作用是很有用的。比值越高, 说明线粒体愈接近完整。而且如图 19-9 所示, 我们可以从已知量 ADP 引起的额外氧耗量得到  $\Delta ADP/O$  比值。它和上述的 P/O 比值相等。

正常构象

聚缩构象



0.5 微米



0.5 微米

图 19-10 小白鼠肝线粒体由静息呼吸状态(状态4)转变成活跃呼吸状态(状态3)时, 超微结构改变的电子显微图。内膜-基质隔室在结构和体积上的明显改变是由于 ADP 与线粒体膜上的 ADP-ATP 移位酶分子结合而引起的。

由于呼吸状态 4 (无ADP) 和状态 3 (过量ADP) 之间转化的结果(图 19-10), 线粒体的超微结构发生引人注意的可逆变化。C. R. Hackenbrock 首先描述了这种效应, 其他的人也进行了许多研究。此效应的结果导致内膜-基质隔室的体积和构型发生改变。在缺乏 ADP 时, 呼吸线粒体内膜与外膜结合填满了内部空间, 这称之为正常态。若将 ADP 加入起始的呼吸状态 3 (活跃呼吸) 时, 基质聚缩, 使其体积仅约为正常体积的 50%, 内膜和

嵴的折叠更紧密,也更加弯曲,此时称之为聚缩态。正常态和聚缩态的构型分别反映着线粒体的 ATP 产生系统的“关”和“开”状况。在完整的呼吸的肝细胞内线粒体则处于状态 4 和 3 的正中间。在正常的完整细胞中,ADP 的浓度相当低,不足以产生最大的呼吸速率。当细胞受到刺激致使呼吸速率增加时线粒体将处于聚缩态,相当于呼吸状态 3。

### 氧化磷酸化作用的解偶联和抑制

长久以来,氧化磷酸化作用的分子机制是一个争论的问题。已用了许多实验方法来阐明中间步骤。一个重要的方法是使用特殊的抑制剂,以便将整个过程分解成一些单个的反应。影响氧化磷酸化作用的化学试剂很多,可以分为三大类(表 19-4)。解偶联剂允许电子继续传递,但阻断 ADP 磷酸化生成 ATP,就是说它们使贮能反应与产能反应解偶联。在缺乏 ADP 时,它们能特征性地刺激完整线粒体的摄氧速率(图 19-11)。而且它们

表 19-4 影响氧化磷酸化作用的试剂类型

解偶联剂 2,4-二硝基苯酚 双香豆素 碳酸酐苯胺 水杨酰苯胺	离子载体(阳离子载体) 缬氨霉素 短杆菌肽 无活性菌素 尼日利亚菌素
ATP 生成抑制剂 寡霉素 芸香霉素 金绿霉素 三乙基锡	

解偶联剂的作用。向呼吸线粒体(处于有底物、磷酸盐、 $Mg^{2+}$  的缓冲介质之中)加入 ADP,可引起摄氧速率一般性的跃增,但若加入解偶联剂,如 2,4-二硝基苯酚,则导致呼吸作用的无限增强,常比加入 ADP 引起的还高。

寡霉素的作用。寡霉素不能抑制呼吸状态 4,但能阻止 ADP 引起的促进作用,特别是有寡霉素存在时,解偶联剂仍有提高氧耗的作用。

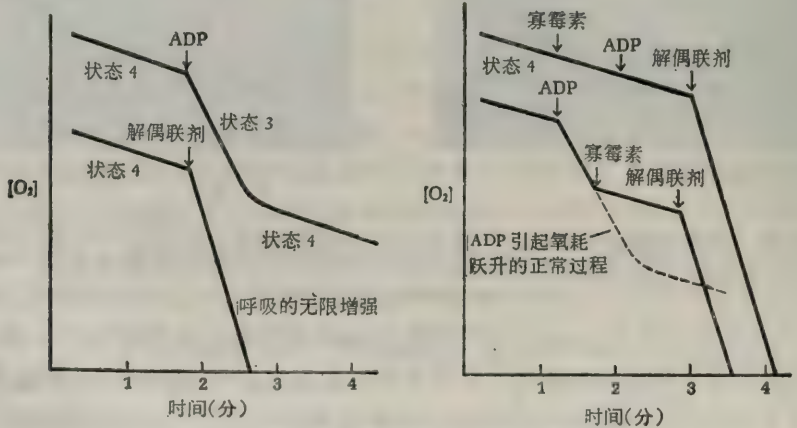


图 19-11 解偶联剂与寡霉素对线粒体耗氧率的影响

引起线粒体内 ATP 水解活力大大增强;在没有解偶联剂时,线粒体很少有 ATP 酶活性。



1948 年 W. F. Loomis 和 F. Lipmann 首先提出的解偶联剂是 2,4-二硝基苯酚。今天已发现了许多不同的解偶联剂。大多是含有一个酸性基团的脂溶性物质,通常还含有一个芳香环。具有代表性的解偶联剂示于图 19-12。这些试剂不能使酵解磷酸化作用解偶联,或直接影响氧化磷酸化作用以外的其他细胞反应。解偶联剂的作用是使高能中间产物或者电子传递中产生的状态受阻断或消失。以后我们还将看到解偶联剂可以促进  $H^+$  离子通过线粒体膜,而正常是不能通过的。

第二类试剂是氧化磷酸化作用的抑制剂。和解偶联剂不同,它们阻止 ADP 对耗氧量的刺激作用和磷酸化成 ATP 的作用。然而这些试剂并不是直接抑制呼吸链的任何电子载体,它们却阻止利用电子传递产生的高能中间产物或高能状态以生成 ATP 的机制。其结果是使电子不能继续传递,除非耗尽了高能中间产物或状态。抗菌素寡霉素的作用首先是 H. A. Lardy 及其同事所提出,它是这类试剂(表 19-4)的典型代表。这类试剂对氧耗的抑制作用可被 2,4-二硝基苯酚及其他解偶联剂明显地缓解,后者促使电子传递所产生的高能中间产物或状态受破坏(图 19-11)。

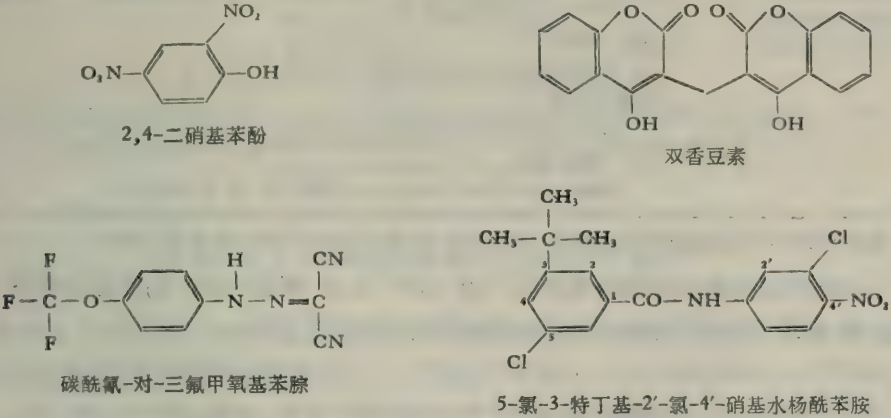


图 19-12 某些解偶联剂

第三类试剂是离子载体 (ionophore), 只有当某些一价阳离子存在时,才引起高能中间状态的破坏。这类试剂的典型代表是缬氨霉素(表 19-4)。其抑制作用需  $K^+$  离子参与。此外,本类试剂还包括抗菌素尼日利亚菌素和无活性菌素,它们也需要  $K^+$  离子参与作用;短杆菌肽的作用则需要  $K^+$  离子或  $Na^+$  离子参与。已有 50 种以上不同的抗菌素具有这种作用。这些试剂之所以称为离子载体是因为它们能和特殊阳离子形成脂溶性复合物,于是能够穿过线粒体膜。缬氨霉素- $K^+$  离子复合物能迅速通过线粒体膜;没有缬氨霉素存在时,  $K^+$  离子通过膜的速度很慢。离子载体能阻断氧化磷酸化作用是因为它们迫使线粒体利用呼吸能将阳离子(如  $K^+$  离子)泵入基质内,而不让其能量用于制造 ATP。泵入的阳离子很快又漏出来。

### 氧化磷酸化作用的分部反应

完整线粒体催化的四个反应可受 2,4-二硝基苯酚和寡霉素的特殊影响(表 19-5)。因此,这四个反应被认为代表着氧化磷酸化作用时 ATP 形成机制中的各个步骤。这些反应

常被称为分部反应,似乎是在呼吸链上没有净电子流时发生的。第一个分部反应是线粒体的 ATP 酶活性,正常时此酶活性很低,而 2,4-二硝基苯酚和其他解偶联剂能大大增强其活性。特别的是,已增强的 ATP 酶活性可被寡霉素所抑制。有人认为线粒体 ATP 酶活性代表了正常时由 ADP 和磷酸生成 ATP 的反应的逆反应。第二个分部反应是同位素交换反应,用<sup>32</sup>P 标记的无机磷酸盐在没有电子传递的情况下可迅速与 ATP 的末端磷酸基进行交换,这个反应叫做磷酸盐-ATP 交换,能被 2,4-二硝基苯酚或寡霉素完全抑制。第三个分部反应是介质水分子中的氧原子与无机磷酸盐中的氧原子进行交换,这可以用<sup>18</sup>O 标记的磷酸盐或水来测定,在这种交换中磷酸盐并没有净消失,这一反应(磷酸盐-水交换反应)也能被 2,4-二硝基苯酚和寡霉素所抑制。第四个分部反应是 ATP 分子末端磷酸基迅速而可逆地转移给 ADP,称之为 ADP-ATP 交换反应,它也能被 2,4-二硝基苯酚和寡霉素所抑制。

表 19-5 氧化磷酸化作用的分部反应

ATP 酶活性被解偶联剂激活
$ATP + H_2O \longrightarrow ADP + P_i$
ATP-磷酸交换
$AMP \sim P \sim P + P_i \rightleftharpoons AMP \sim P \sim P + P_i$
磷酸-水交换
$HPO_4^{2-} + H_2O \rightleftharpoons HPO_4^{2-} + H_2O$
ADP-ATP 交换
$AMP \sim P + AMP \sim P \sim P \rightleftharpoons AMP \sim P \sim P + AMP \sim P$

黑体字母表示是用同位素标记的组分, AMP~P~P 表示 ATP, AMP~P 表示 ADP。

分部反应的这些性质强烈地表明,由 ADP 和 P<sub>i</sub> 形成 ATP 的反应过程是可逆的。并且这为 ATP 生成过程的个别反应的实验研究提供了方法。

### 磷酸化电子传递作用的可逆性

氧化磷酸化反应是可逆的,已有了较直接的方法来证明。在一种类型实验中是用增添了琥珀酸和草酰乙酸的线粒体与氰化物一起保温,以抑制电子传递给氧。当向此系统中加入 ADP 时,电子可由电子传递链的可逆方向从琥珀酸传递到草酰乙酸,即:



结果使草酰乙酸还原成苹果酸。与此同时,通过能量偶联反应第一步的逆反应,ATP 分解成 ADP 和 P<sub>i</sub>。因此,要使与能量偶联的电子传递反向,则需要 ATP。在适当的条件下,呼吸链中其他两个贮能步骤也可被逆转。

### 亚线粒体系统中的氧化磷酸化作用

虽然氧化磷酸化是一种很不稳定的反应,长期以来,仅能在新鲜制备的完整线粒体中才能观察到,现在已能制备出具有电子传递和氧化磷酸化能力的亚线粒体颗粒。用膜分散剂(如非离子去污剂——毛地黄皂甙或 Lubrol)处理,或用高频率声波照射线粒体的方法可以获得这种颗粒。这种颗粒是由内膜碎片重新封闭起来的膜囊泡,只有当膜完全封闭



才能催化氧化磷酸化反应。表明完整的囊状结构对发生能量贮存过程来说是需要的。

显然这种膜囊泡的外表面含有内膜球粒,表明大部分膜囊泡是由嵴断裂所产生的(图 19-13)。因此与完整线粒体内膜相比,亚线粒体囊泡是内膜外翻形成的。对这种囊泡进行的生化和电子显微镜研究,已成功地分离出线粒体膜上 ATP 形成系统中某些蛋白质成分。

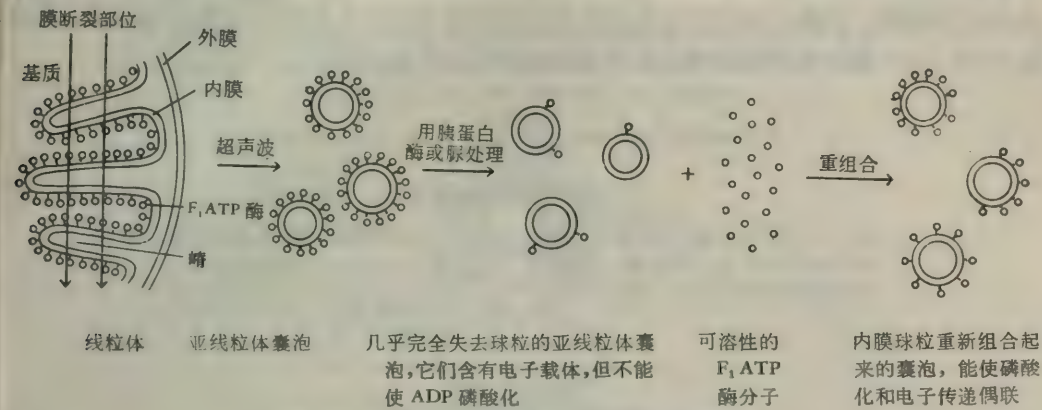


图 19-13 图示具有磷酸化能力的亚线粒体囊泡的制备

它们可以分解成不具磷酸化能力的囊泡和 ATP 酶,并且可以重新组成具有磷酸化能力的囊泡。与衍生它们的线粒体相比较,大多数囊泡是外翻形成的。[引自 E. Racker: Biochemistry, P. 1—22, Vol. 6, Academic Press Inc., London, 1970]

## 偶联因子和氧化磷酸化作用的重建

E. Racker 及其同事已经发现,把从牛心线粒体制备的具磷酸化能力的亚线粒体囊泡用机械振荡或用胰蛋白酶和尿素处理时,可得到两个部分:(1) 仍能催化电子传递但不再能使 ADP 磷酸化的膜囊泡;(2) 能催化 ATP 水解但不催化电子传递的可溶性蛋白质部分。用负对比染色电子显微镜观察,发现用这种方法处理过的膜囊泡,其外表面上不再具内膜球粒。这些发现提示电子传递和磷酸化作用的偶联与内膜球粒有关。如果把膜部分和可溶性部分合并时,氧化磷酸化活性明显地恢复(图 19-13),而且在囊的表面上又观察到有内膜球粒。2, 4-二硝基苯酚可使氧化磷酸化解偶联,而寡霉素则有抑制作用。根据这些重新组合实验, Racker 及其同事推论线粒体膜提供了电子传递的酶类,而组成内膜球粒的可溶性的容易分离的蛋白质部分,则代表了制造 ATP 时所需的酶复合物。使线粒体膜恢复能量偶联活性所必需的可溶性蛋白质叫做偶联因子。Racker 所称的可溶性偶联因子叫做 F<sub>1</sub> (或因子 1),因为它也能催化 ATP 水解,所以往往又叫做 F<sub>1</sub> ATP 酶。

Racker 及其同事成功地提纯了心肌线粒体的可溶性 F<sub>1</sub> ATP 酶。同样,其他的人提纯了大白鼠肝脏线粒体的 F<sub>1</sub> ATP 酶。F<sub>1</sub> ATP 酶是一种分子量为 360,000—380,000 的复杂的大分子,直径达 9 毫微米。在 Mg<sup>2+</sup> 离子存在时能催化 ATP 缓慢地水解成 ADP 和磷酸盐,这一反应不为寡霉素所抑制。ATP 酶活性被认为代表了完整线粒体中 F<sub>1</sub> 的正常功能(即从 ADP 和无机磷合成 ATP) 的逆反应。将 F<sub>1</sub> 称为 ATP 合成酶也许较称之为 ATP 酶更为恰当。在 0℃, F<sub>1</sub> 因子不稳定,但在室温相当稳定,具有变构酶的特性。F<sub>1</sub> 含 5 或 6 种蛋白亚基,亚基的分子量约为 60,000、57,000、36,000、12,500 和 7,500,每一型

亚基的精确数字尚不完全清楚。 $F_1$  分子与 ADP 结合紧密,但不与磷酸结合。很明显,抑制氧化磷酸化作用的抗菌素金绿霉素(表 19-4)能抑制  $F_1$  与 ADP 结合。

另外一种在电子传递与合成 ATP 偶联中起作用的特殊蛋白质是对寡霉素敏感的授予因子,简称为 OSCF 或  $F_0$ 。当将  $F_0$  因子加入到  $F_1$  因子中去时,囊泡的 ATP 酶活性可被寡霉素抑制,因此  $F_0$  因子授予  $F_1$  因子对寡霉素的敏感性。 $F_0$  本身又是含 5 或 6 个亚基的大分子物质。从线粒体可以分离出含  $F_1$ 、 $F_0$  的复合物;也含有分子量为 10,000、能抑制  $F_1$  的 ATP 酶活性的蛋白质。 $F_1$ - $F_0$  复合物如图 19-14 所示。

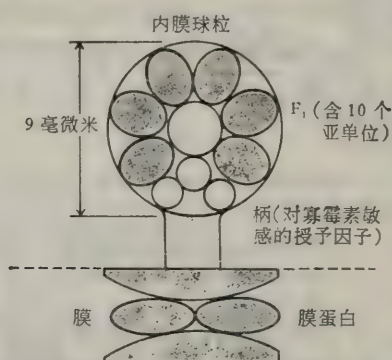


图 19-14 线粒体 ATP 酶复合物。 $F_1$  含 5 或 6 种不同的亚单位(包括两套大的亚单位)柄及部分膜含有对寡霉素敏感的蛋白质类,如图所示,不是全部都含亚单位。暗用负对比染色后可以见到球粒和柄的图象。

用亚线粒体囊泡及其组分进行的这些实验不仅打开了研究 ATP 形成系统的大门,而且证明线粒体上能量偶联酶类的复合物颗粒既可以分离开来,而后再可以重建起来。

## 氧化磷酸化作用的机制

尽管过去四分之一世纪中许多实验室进行了精深的研究,可是我们现在对电子传递中氧化还原能量被转化贮存在 ATP 磷酸键能中去的分子机制仍然缺乏详尽的了解。有三种假说引起了广泛的注意,即化学偶联、构象偶联和化学渗透偶联假说。这些假说在细胞生物学上有宽广的意义,因为它们不仅可以应用于解释线粒体和细菌的氧化磷酸化作用,而且如我们将要讨论的,可以用于解释光合磷酸化作用。

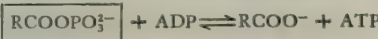
### 化学偶联假说

关于氧化磷酸化作用机制的最早假说是化学偶联假说。这个假说设想产能的电子传递反应和形成 ATP 的需能反应相偶联,生成 ATP 则须经由 ADP、磷酸和一个共同的中间产物,即在电子传递中产生的一种高能化合物,它在第二个反应中作为作用物和 ADP、磷酸一起生成 ATP。事实上这种连锁反应共同中间产物的原则自然是细胞内各种代谢程序的基础。将氧化还原能量转化为 ATP 能量贮存的这种化学偶联机制的最简单、为大家所熟知的模型或典型是糖酵解中 3-磷酸甘油醛脱氢酶催化的氧化还原贮能反应。在这个反应中(图 19-15),醛基氧化成羧基释放的能量被贮存在共同的中间产物——1, 3-二磷酸甘油酸之中,然后将其高能磷酸键提供给 ADP, 因此这些反应在化学上发生了偶



联。图 19-15 也是一种在 1953 年由 E. C. Slater 提出的关于氧化磷酸化作用化学偶联假说的早期形式。这个假说认为电子从呼吸链上的一个电子载体传递到下一个电子载体时产生了高能中间化合物，即水解时具有很高的负标准自由能的产物。这个共同的中间产物提供了由 ADP 和  $P_i$  形成 ATP 的能量。另外还有一些作者提出了更为复杂的带有附加步骤的化学偶联图。

糖酵解中的化学偶联。3-磷酸甘油醛 (RCHO) 的醛基被  $NAD^+$  氧化，产生的能量贮存于 3-磷酸甘油酸磷酸酯 ( $RCOOP_3^{2-}$ ) 中，它作为共同的中间产物，将能量带给下一步 ADP 磷酸化成 ATP 的反应。



呼吸链的简单化学偶联假说。 $AH_2$  是链中一种还原型电子载体，B 是下一个氧化型的电子载体，C 是第三个分子组分，偶联因子。假设电子从  $AH_2$  传递到 B 时，引起 A 和 C 之间形成高能键 ( $\sim$ )， $A\sim C$  是联接此反应和 ATP 形成反应的共同中间产物。



图 19-15 在电子传递反应和 ATP 合成之间，经过共同的化学中间物进行能量转导反应的化学偶联机制。

虽然化学偶联假说已经指导了很多研究，但有两个严重的缺点：第一是，在深入研究达 20 年之后从来未能自线粒体中测出那种设想的能量偶联所需要的高能中间化合物，因此许多研究者感到这种中间产物并不存在。第二个缺点是化学偶联假说不能满意地解释氧化磷酸化作用的发生必须要求线粒体内膜是一个完整的、连续的、如同完全密闭的囊泡这一事实。事实上，对于化学偶联反应的发生来说，膜不是必需的因素；我们记得，糖酵解中 3-磷酸甘油醛的氧化贮能是在均一的水溶液中发生的。现在对化学偶联学说虽然有少数支持者，但是仍可想象到，膜的双脂层提供了非极性相，在非极性相中可以产生和利用一种不稳定的中间产物，它可能在水相中很容易被水解。

### 构象偶联假说

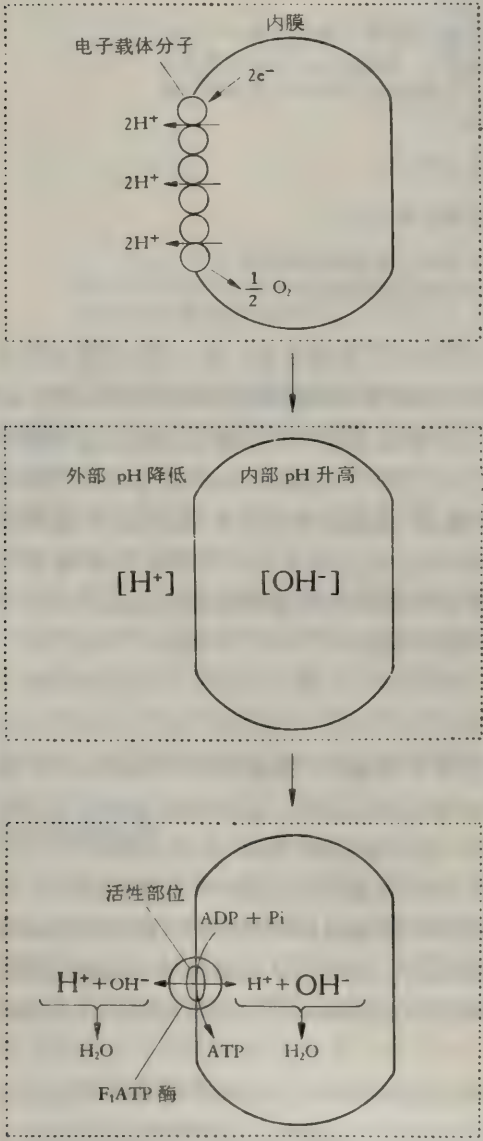
有几个研究者，特别是 P. D. Boyer，曾提出电子传递时产生的能量可能是以电子载体蛋白质或偶联因子 ( $F_1$  ATP 酶) 分子的构象改变方式贮存的。此种高能构象状态可能是与能量有关的弱键在数目和位置上移动的结果，而这些弱键(氢键、疏水基的相互作用)是维持蛋白质三维构象的。有人建议，“能量化了的”构象 (“energized” conformation) 所蕴藏的能量用于使 ADP 和  $P_i$  生成 ATP；与此同时，载能蛋白回复到原有的低能构象状态。构象偶联假说原则上是从化学偶联假说变异来的，此假说认为高分子中大量弱的非共价键用于形成 ATP 的共同中间产物或能量载体，而经典的化学偶联假说则认为共同中间产物的单一共价键就是能量转变的媒介。

在骨骼肌的肌纤凝蛋白系统中，当 ATP 被结合和水解，而且 ADP 被释放时发生的构象改变可看作是构象偶联的典型例子。在电子沿呼吸链流动时，观察到线粒体内膜发生非常迅速的物理变化，这也是对构象偶联假说有力的支持。膜的上述物理变化可用与

膜结合的探查分子(如 1-苯胺基萘酚-8-磺酸)的荧光测定法来证明。向呼吸的线粒体加入 ADP 时所引起的超微结构的明显改变也支持构象偶联的观点。但是目前对构象偶联假说还没有明显的证据。

### 化学渗透偶联假说

这个假说最初于 1961 年提出,而且曾得到英国生物化学家 P. Mitchell 的积极支持。此假说否定有一个共同的化学中间产物和氧化磷酸化作用中的产能和需能反应相偶联。它假设这些反应是与高能中间状态相偶联,而不是与一个化合物相偶联。Mitchell 设想有一个  $H^+$  离子电化学梯度横跨线粒体内膜,作为偶联从电子传递到 ATP 形成的能流的一种方



电子传递使  $H^+$  离子穿过线粒体内膜向外泵出,产生了  $H^+$  离子浓度梯度,这一时相详见图 19-17。

$H^+$  离子浓度梯度是高能状态,能量是由电子传递能量转变贮入的,膜内变成碱性,膜外较为酸性。

$H^+$  离子浓度梯度是使 ADP 磷酸化的直接动力,磷酸化时便移除  $HOH$ 。内室的  $[OH^-]$  较高,吸引  $F_1ATP$  酶活性部位来的  $H^+$  离子。外部  $[H^+]$  较高,吸引  $OH^-$  离子向外。因为水的离子积 ( $K_w = [H^+][OH^-]$ ) 很低 ( $10^{-14}$ ),电子传递所产生的  $OH^-$  和  $H^+$  分别有效地捕获  $H^+$  和  $OH^-$ 。ATP 的形成详见图 19-18。

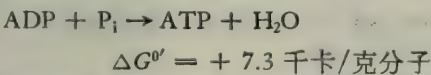
图 19-16 化学渗透偶联假说的简图



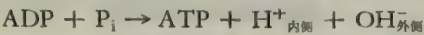
式。根据化学渗透偶联假说,膜是偶联机制的整合部分,若要发生氧化磷酸化作用,膜必须是完整的,必须是一种连续的密闭的囊泡。Mitchell 还认为,呼吸链的电子载体起了主动运输系统或泵的作用,以便将  $H^+$  离子从线粒体基质内通过内膜运输到线粒体膜外,这样就产生了跨膜的  $H^+$  离子浓度梯度,他假定膜对  $H^+$  离子是不通透的。于是设想所产生的电化学梯度由于引起 ADP 和  $P_i$  脱水而促使 ATP 生成。(图 19-16)

化学渗透偶联假说的特点是受跨线粒体膜的向量化学反应的控制,即反应具有几何方向性,这是与发生在均一溶液中的非方向性(或无向量)化学反应对比而言的。由于线粒体内膜上电子载体蛋白的特殊向量排列的效能,电子传递被看作是产生跨膜的  $H^+$  离子梯度的,所以吸取  $H^+$  离子的反应(表18-7)发生在内膜的内表面,而产生  $H^+$  离子的反应则在外表面。于是,电子传递链被看作是将电子传递时所释放的能量转换成  $H^+$  离子电化学梯度能量的一种装置。贮存在这种梯度中的自由能是膜两侧  $H^+$  离子相对浓度的函数,称为质子运动力。现认为电子每通过一个贮能部位时就有 2 个  $H^+$  离子被泵出线粒体外。(图 19-17)

高能的  $H^+$  离子梯度用以引起从 ADP 和  $P_i$  经由一向量反应生成 ATP,此向量反应则包括假想的内膜  $F_1-F_0$  ATP 酶复合体在内。从 ADP 和磷酸脱去  $H_2O$ ,通常用总方程式表示之:



可以极简单地看作在  $F_1$  ATP 酶的活性部位,从 ATP 上不对称地或有向量地脱去  $H^+$  和  $OH^-$ ,  $H^+$  离子出现在膜内侧,而  $OH^-$  离子则出现在外侧:



因此  $H^+$  离子被释放到基质中由电子传递产生的碱性水槽里,  $OH^-$  离子被释放到膜外侧产生的(图 19-18)酸性的水槽里。因此,电子载体分子和 ATP 形成酶二者都必须固定在膜上面,使其活性部位有特殊的方向性。线粒体电子传递过程中不断地产生高能的  $H^+$  离子梯度,而 ADP 的磷酸化则不断地消耗  $H^+$  离子梯度中所蕴藏的能量。结果形成一种净  $H^+$  离子梯度很小或没有梯度的稳定状态。

很多证据与化学渗透偶联假说是一致的。对于氧化磷酸化作用来说,完整的线粒体膜是必需的因素,也已经发现膜对  $H^+$  离子是不通透的。并且跟假设的一样,电子传递链可以向外泵出  $H^+$  离子,而形成 ATP 时伴有  $H^+$  离子向内的移动。与 Mitchell 的预言一

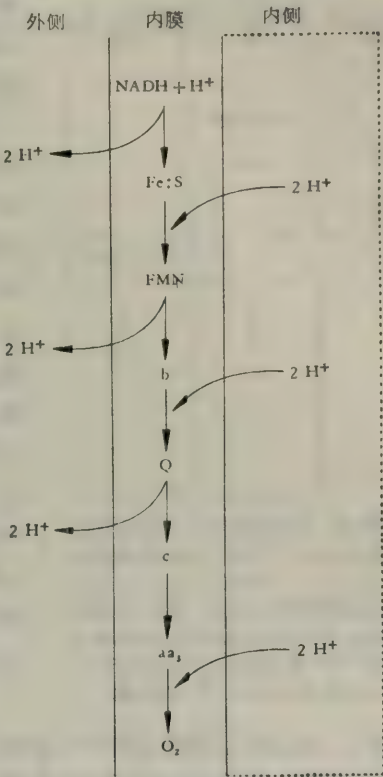


图 19-17 化学渗透偶联假说中质子被泵出的机制。据认为,在电子和氢沿呼吸链传递时(第十八章),有三对质子从线粒体膜的内侧(或基质侧)被释放到膜的外侧(或胞液侧),即在 FMN 被 NADH 脱氢酶还原、泛醌还原和氧还原时各需要一对。其结果是使膜外侧较酸,基质内较碱。

应该注意,这里所假定的电子载体排列顺序和第十八章所指出的不同,即将泛醌排在细胞色素 b 和 c 之间,和多数证据是相反的。这种改变是必要的,以便使膜上吸取  $H^+$  离子和产生  $H^+$  离子的反应有恰当的分侧。

致,解偶联剂如 2,4-二硝基苯酚可使不能穿透线粒体膜的  $H^+$  离子穿过线粒体膜,因此瓦解了电子传递所产生的质子梯度。我们已经看到的外翻亚线粒体膜囊泡,在电子传递到氧时可以从介质中吸取  $H^+$  离子,而完整的原来未翻动的线粒体将  $H^+$  离子逐入介质中,表明线粒体膜对于质子泵的方向真正具有分侧性。

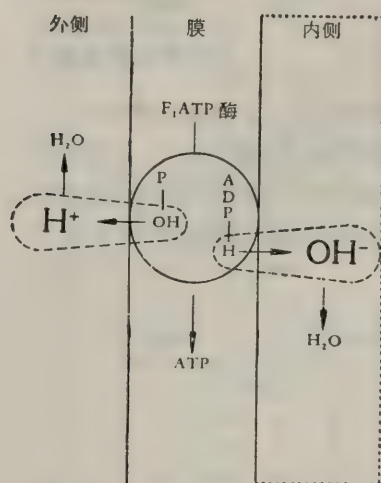
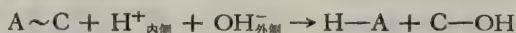


图 19-18 在消耗跨膜  $H^+$  离子梯度以生成 ATP 时,  $F_1$  ATP 酶的向量反应图示。

假定其活性部位有结合 ADP 和磷酸的部位,并能从它们的分子中分别除去  $H^+$  和  $OH^-$  使之脱水,其脱下的  $H^+$  进入基质侧,而  $OH^-$  进入膜外侧。

早期对化学渗透偶联假说的反驳是,在标准的热力学条件下,从 ADP 生成 ATP 看来需要很大的跨膜  $H^+$  离子梯度。可以计算出,为了保证在标准条件下由 ADP 合成 ATP 所需要的 7.3 千卡自由能,那么跨膜的  $H^+$  离子梯度就必须约为 3,000:1,或 pH 约为 3.5 单位。然而 Mitchell 指出,不是所有需要的电化学梯度都必须表现为跨膜 pH 的巨大差别;有些也可表现为跨膜的电位差。事实上,3.5 pH 单位的梯度,外侧酸性,在能量学上相当于跨膜的电位差 0.235 伏;与外侧相比,内侧是负的。Mitchell 提示呼吸能量化的线粒体产生跨膜的实际电化学梯度或质子运动动力,可以由 1.0 pH 单位(酸性外侧)梯度加上跨膜电位差约 0.150 伏(内侧为负)所组成。间接实验有力地表明电子传递可以产生这样大小的带有适当极性电荷的膜电势。

虽然现在一致认为,在电子传递时线粒体能逐出  $H^+$  离子,但仍然不清楚这样产生的质子梯度,如化学渗透偶联假说中所假定的那样,是否是氧化磷酸化作用的必不可少的步骤,还是由电子传递产生的高能中间产物 ( $A \sim C$ ) 的向量水解引起的副反应的结果。(图 19-19)



化学渗透偶联。假定跨膜的  $H^+$  离子梯度是能量贮存的主要方式,并且是氧化磷酸化作用的限速步骤。

电子传递

$\Delta H^+$

ATP

化学偶联。假定高能中间产物  $A \sim C$  是氧化磷酸化作用的限速步骤,而  $H^+$  离子梯度则是副反应的结果。

电子传递

$A \sim C \rightleftharpoons \Delta H^+$

ATP

图 19-19 ATP 形成过程中  $H^+$  离子梯度的作用: 现代的两重争论。

虽然至今仍不能排除化学偶联和构象偶联模式,但在线粒体、细菌内电子传递时以及在光合生物中由光引起的电子传递时,其能量转换机制的许多实验证据,似乎用化学渗透偶联假说可作出最简单而直接的解释。



## 内膜中的代谢物运输系统

在某些条件下,线粒体可以将大部分有效的呼吸能用于其它目的而不是用于 ADP 的

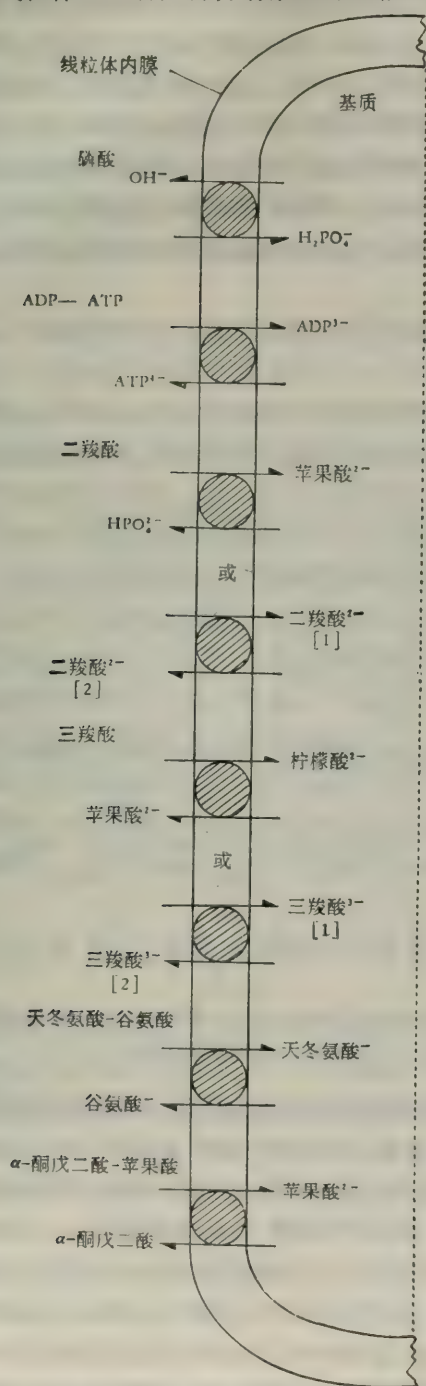
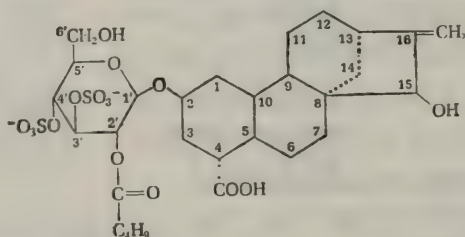


图 19-20 大白鼠肝线粒体内膜上的重要运输系统,它们可以根据被运输的代谢物的浓度梯度向任一方向发挥作用。

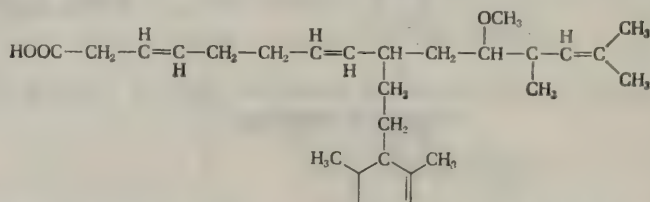
磷酸化作用。这些活性之一是运输某些代谢物或无机离子，使之逆浓度梯度穿过线粒体膜。这种与代谢的分室和调节有关的线粒体活性，涉及内膜上的特殊运输系统。

线粒体外膜可让大多数低分子溶质自由通透，但内膜却不是这样，其通透性有高度的选择性。完整的非呼吸的肝线粒体不容许简单的糖（如葡萄糖和蔗糖）、阳离子（如  $K^+$  和  $Na^+$ ）或阴离子（如  $Cl^-$  和  $Br^-$ ）通透。而且内膜也不让  $NAD^+$ 、 $NADH$ 、 $NADP^+$  和  $NADPH$ ，其他核苷酸（如 AMP、CTP、GTP、CDP 和 GDP）、CoA 和脂酰 CoA 通透。因此得以使含有这些辅酶类和核苷酸池的线粒体内室或基质和胞汁中的线粒体外池在自然区域上分隔开来。另一方面，肝线粒体的内膜却允许某些特殊核苷酸和代谢物迅速通透。其中如 ATP 和 ADP、无机磷酸、丙酮酸、柠檬酸、琥珀酸、 $\alpha$ -酮戊二酸和苹果酸以及氨基酸（谷氨酸和天冬氨酸）都是。这类溶质透过线粒体膜是借特殊的运输系统的作用而发生的。

线粒体运输系统可能是特殊蛋白质类或蛋白质组，它们对某些代谢物是特异的，即使是极其相似的分子也不运输。例如，ATP 运输系统只能运输 ADP、ATP、dADP、dATP，但不运输 AMP 及其他类似核苷酸（如 GTP、GDP、CTP 及 CDP）。线粒体的某些运输系统能被特异地抑制。例如，ATP 和 ADP 运输系统能被极低浓度的苍术甙所抑制。（见下）



苍术甙，从地中海蓟——树胶苍术 (*Atractylis gummiifera*) 中分离出来的一种毒性糖甙，



米替霉酸，一种抗菌素，印度尼西亚人食用的椰子粉腐败后，生长一种霉菌所产生的。

图 19-21 苍术甙和米替霉酸的结构

图 19-20 表示大白鼠肝线粒体的主要运输系统及其所促进的运输过程类型。这些运输系统也叫做载体、移位酶或搬运者。对 ATP-ADP 载体曾进行了最充分的研究。正常时这个载体促进一分子外部的 ADP 与在基质内由氧化磷酸化形成的一分子内部的 ATP 进行可逆的等克分子交换。这个载体对 ADP 有很高的亲和力，至少需 10 微克分子 ADP 才能接近饱和。能被有毒的植物性化合物苍术甙及抗菌素米替霉酸特异而强烈地抑制(图 19-21)。磷酸载体促使  $H_2PO_4^-$  离子和  $OH^-$  离子或其当量的交换，以及  $H_2PO_4^-$  和  $H^+$  离子二者同方向的协同运输，磷酸载体可被某些巯基试剂所抑制。

二羧酸载体(图 19-20)促进苹果酸、琥珀酸和延胡索酸相互间或它们与磷酸进行等克分子交换。三羧酸载体能促进柠檬酸和异柠檬酸相互间的等克分子交换，以及三羧酸



与二羧酸(如苹果酸)的等克分子交换。

线粒体内膜上的运输系统具有种属特异性并由遗传所决定。虽然所有组织的线粒体都含有磷酸、ADP 及 ATP 运输系统,但其他运输系统的分布则随种属而变化。

对不同细胞类型线粒体的这些及有关观察得到的一般结论是:燃料分子如丙酮酸、脂肪酸、氨基酸以及磷酸和 ADP,必须经由特殊运输系统才能从胞汁穿过内膜到达线粒体的基质隔室,在这里发生三羧酸循环反应、电子传递作用、氧化磷酸化作用。内部隔室中氧化磷酸化作用所生成的 ATP 必须经 ADP-ATP 载体才能横过膜进入胞汁,线粒体内的 ADP 和 ATP 贮池和这些核苷酸在胞汁中的贮池是隔开的,但是这两个贮池经苍术甙敏感载体得以沟通。这种分隔现象和各种代谢物穿过线粒体膜时的特殊运输在酵解作用和呼吸途径的调节,以及有三羧酸循环参与的生物合成途径中是很重要的。

## 代谢物运输与电子传递的偶联

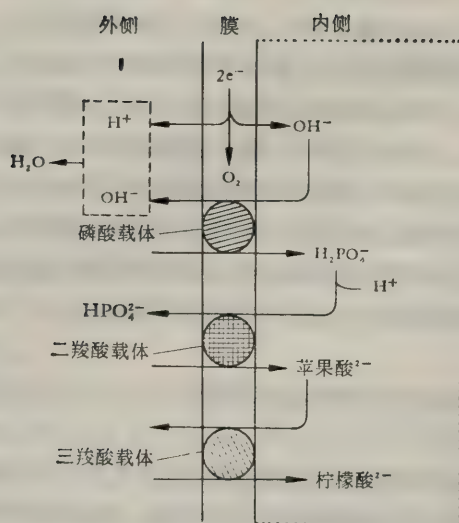
图 19-20 所示的各种代谢物的运输系统都是被动运输系统(定义见第二十八章)。在非呼吸状态,它们顺浓度差运输代谢物,其方向与跨膜的热力学平衡一致。然而当这些系统和电子传递偶联作为能量来源时,它们也可以逆浓度差运输其代谢底物。我们早已看到电子传递时产生的能量能使跨越线粒体膜的  $H^+$  离子形成浓度梯度。这种梯度反过来可以被利用使某一代谢物逆浓度差运输,出线粒体或进线粒体。例如,呼吸的线粒体通过磷酸载体的作用可以逆浓度差而摄取周围介质中的磷酸(图 19-22)。这样产生的磷酸梯度也能通过二羧酸载体逆浓度差而引起苹果酸的蓄积。苹果酸梯度反过来又可以通过三羧酸载体产生柠檬酸梯度(图 19-22)。就是这样,通过底物特异性,线粒体上的各种运载系统就能够与电子传递链联系起来成为能量的来源。

图 19-22 也表明,因在横过膜后电荷分布得到平衡,所以也就使磷酸载体引起外部的  $ADP^{3-}$  和内部的  $ATP^{4-}$  发生等克分子交换成为可能。因此,在使呼吸链释放的能量与各种代谢物的运输的偶联上,磷酸载体是一种必需的联系物。

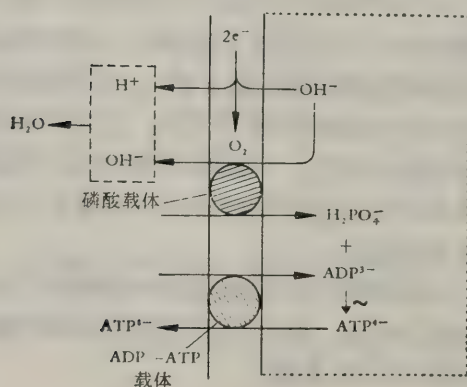
## 通过线粒体运输依赖于呼吸作用的 $Ca^{2+}$

动物组织的线粒体也能在能量上与电子传递偶联的过程中逆浓度梯度蓄积某些阳离子,特别是  $Ca^{2+}$  离子。 $Ca^{2+}$  离子的蓄积伴有等量磷酸的摄取。每对电子从 NADH 传递到氧时,约从介质和蓄积 6 个  $Ca^{2+}$  离子,每个贮能部位两个(图 19-23)。当线粒体用这种方式蓄积  $Ca^{2+}$  离子的时候,不发生 ADP 的氧化磷酸化。因此电子传递所产生的能量可以用于  $Ca^{2+}$  离子的蓄积或 ATP 的形成,但不能两者同时进行。 $Mn^{2+}$ 、 $Fe^{2+}$  和  $Sr^{2+}$  离子也可被肝线粒体以同样方式蓄积,但  $Mg^{2+}$  离子则不行。金属络合剂钉红和  $La^{3+}$  及其他稀土族阳离子可以抑制线粒体对  $Ca^{2+}$  的运输。

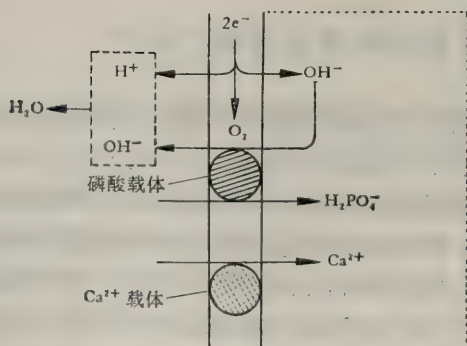
动物组织的线粒体可以蓄积大量的  $Ca^{2+}$  和磷酸,引起基质中电子密度大的磷酸钙颗粒的沉积(图 19-24),这个过程被认为与生物钙化有关。这种特性以及线粒体对  $Ca^{2+}$  离子的高度亲和力,强烈地表明线粒体的  $Ca^{2+}$  运输在脊椎动物细胞中起很重要的生物学作用。



与电子传递偶联的二羧酸和三羧酸向内运输



通过 ADP-ATP 载体,  $ADP^{3-}$  进入,  $ATP^{4-}$  外出



$Ca^{2+}$  的向内运输, 其他阳离子如  $Mn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$  和  $K^+$  也可因膜内电势为负而进入膜内。

图 19-22 在电子传递和跨膜运输之间的能量偶联中磷酸载体的中心作用。如图所示, 磷酸-氢氧化物载体显然是使初级的  $H^+$  离子梯度转变成  $H_2PO_4^-$  内部积聚的媒介物, 因而膜内电势为负, 引起了各种阴离子和阳离子的运输。



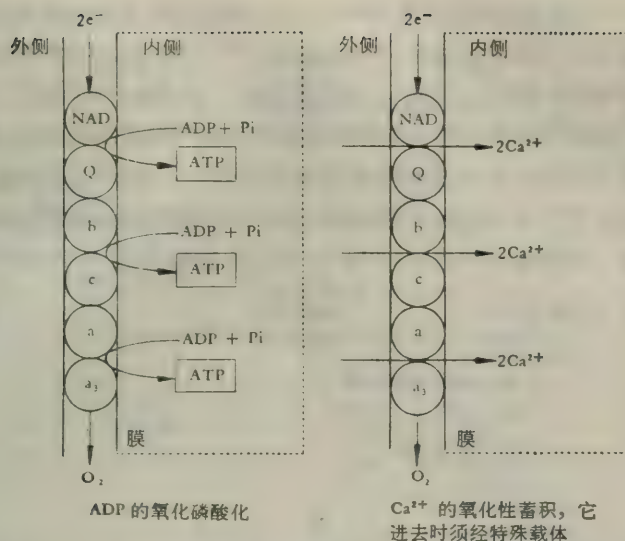
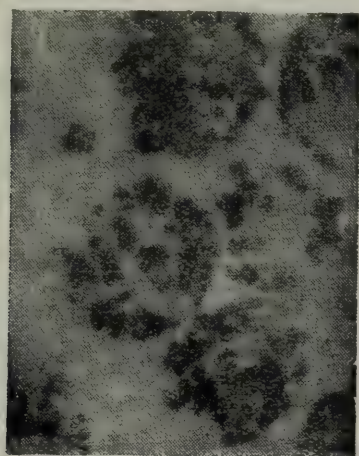


图 19-23 ADP 磷酸化及阳离子的摄取——和电子传递偶联的另一过程



1.0 微米 J.W. Greenawalt

图 19-24 大白鼠肝线粒体的电子显微照片。示与呼吸偶联而积聚的  $\text{Ca}^{2+}$  离子与磷酸盐, 黑的电子密度大的斑点相当于无定形磷酸钙颗粒沉积。

$\text{Ca}^{2+}$  逆浓度梯度向内运输是通过磷酸载体的作用而和电子传递相偶联。(图 19-22)

## 电子从外界(胞汁中) NADH 进入线粒体的梭系

当向肝或其他动物组织的线粒体悬浮液加入 NADH 时, NADH 不被氧化, 然而如果向这种线粒体加入与 NAD 关连的底物, 如苹果酸, 那么它就能经由内部的 NAD 而将苹果酸迅速氧化。从这些及其他观察已经得出结论: 大多数动物组织的线粒体不让 NADH 通过它的膜。这种通透性屏障使细胞质的和线粒体内的吡啶核苷酸池有效地分隔开来。

现在,提出了一个重要的问题:许多与  $\text{NAD}^+$  相连的脱氢酶能在胞汁中还原  $\text{NAD}^+$ , 那么胞汁中的  $\text{NADH}$  怎样才能被线粒体内的电子传递链再氧化成  $\text{NAD}^+$  呢?

线粒体外的  $\text{NADH}$  自己不能撞进线粒体内膜,但其电子对却可以通过间接的方式进入电子传递链,这种间接方式称为梭系,首先发现的  $\text{NADH}$  梭系是磷酸甘油梭系(图 19-25)。胞汁中的  $\text{NADH}$  首先与糖酵解的中间产物之一磷酸二羟丙酮反应,将其还原成 L-3-磷酸甘油,这个反应是由胞汁中的含  $\text{NAD}$  的磷酸甘油脱氢酶所催化:

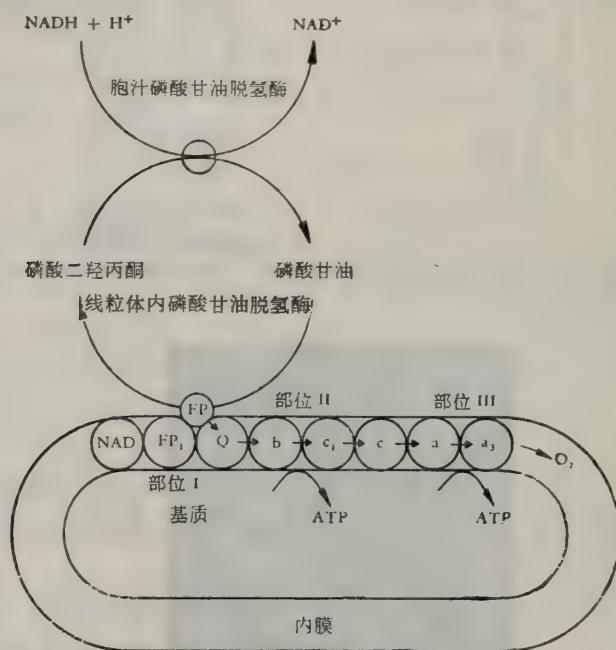
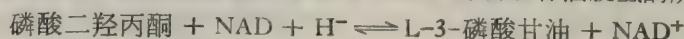
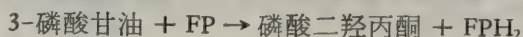


图 19-25 将胞汁  $\text{NADH}$  的还原当量转移至线粒体内电子传递链的磷酸甘油梭系。线粒体磷酸甘油脱氢酶是一种黄素蛋白,它与内膜紧密结合。绕过部位 I 将它的电子交给泛醌(Q),因此每对电子流过呼吸链时,仅产生 2 分子  $\text{ATP}$ 。外膜对磷酸二羟丙酮和磷酸甘油是自由通透的,图中没有表示。

这样生成的 3-磷酸甘油迅速通过外膜,然后被位于线粒体内膜外表面的第二种 3-磷酸甘油脱氢酶所氧化,3-磷酸甘油不必通过内膜即被氧化,线粒体内 3-磷酸甘油脱氢酶不含  $\text{NAD}$ ,而是含黄素的脱氢酶,以  $\text{FP}$  表示,其辅基可被还原:



于是,还原了的酶的还原当量转移到泛醌,然后经内膜上的细胞色素系统传递给氧。此反应中生成的磷酸二羟丙酮又返回胞汁,并从另一分子线粒体外的  $\text{NADH}$  上接受一对电子。因此磷酸甘油-磷酸二羟丙酮氧化还原对起了将线粒体外  $\text{NADH}$  的还原当量转移到线粒体内呼吸链的梭子作用。通过这个梭子而进入呼吸链的一对电子在传递给氧时仅使 2 分子  $\text{ADP}$  氧化磷酸化,因为 L-3-磷酸甘油的一对电子是在第一个贮能部位之后进入呼吸链的。

磷酸甘油梭系是单方向的,在某些肌肉和神经细胞中,它将还原当量转移到线粒体内。而在其他组织,特别是肝脏和心脏,有另一类梭系,即苹果酸-天冬氨酸梭系(图 19-26),这个复合梭系是双向的,它将线粒体外  $\text{NADH}$  的电子转移到线粒体内,也可将线粒



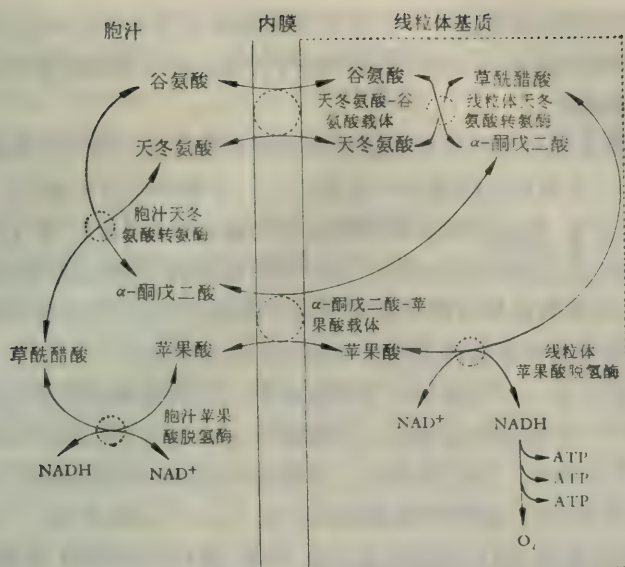


图 19-26 将胞质内 NADH 的还原当量转移到线粒体电子传递链的苹果酸-天冬氨酸梭系。这个梭系包括胞质和线粒体内的苹果酸脱氢酶和天冬氨酸转氨酶以及两种膜载体。在肝和心脏，以这种梭系占优势，每分子胞质 NADH 被氧化时可使 3 分子 ADP 氧化磷酸化。

体内 NADH 的电子转移到胞质。苹果酸-天冬氨酸梭系必须有胞质的和线粒体的苹果酸脱氢酶的同功酶、天冬氨酸-谷氨酸转氨酶以及线粒体膜上苹果酸、 $\alpha$ -酮戊二酸、天冬氨酸、谷氨酸的运输系统以循环状进行协作。通过苹果酸-天冬氨酸梭系，每分子胞质 NADH 被氧化时，可产生 3 分子 ATP，而磷酸甘油梭系则只能产生 2 分子 ATP。

## 还原力从线粒体向胞质的移动

正如我们将要在第二十三章看到的一样，从丙酮酸生物合成葡萄糖时，需要胞质中的 NADH 将 1, 3-二磷酸甘油酸还原成 3-磷酸甘油醛。虽然线粒体不断地从呼吸底物的氧化产生内在的 NADH，而 NADH 本身不能直接进入胞质，但其还原当量可以通过上述苹果酸-天冬氨酸梭系转移到线粒体外的  $\text{NAD}^+$  上。

同样线粒体内的还原当量可以用来生成线粒体外 NADPH。线粒体内的异柠檬酸可借助于膜上的三羧酸载体，穿过线粒体膜而进入胞质。在胞质中，它又可通过与 NADP 相关的异柠檬酸脱氢酶的胞质形成作用把电子供给  $\text{NADP}^+$ ，因此在胞质内产生了 NADPH。在 NADH 的梭系以及转移 NADPH 还原当量的三羧酸载体的作用下，有效地调节着线粒体内外  $\text{NADH-NAD}^+$  对和  $\text{NADPH-NADP}^+$  对的比值。

## 糖酵解和呼吸作用的整合：巴斯德效应

兼性细胞在无氧和有氧条件下都能利用葡萄糖，这种细胞在无氧条件下利用葡萄糖时生成乳酸，葡萄糖降解的速率比同一细胞在有氧条件下快许多倍，这是因为要补偿在酵解过程中每分子葡萄糖所产生的 ATP 较少。复习一下前面讲的每分子葡萄糖在酵解时

仅净产生 2 分子 ATP，而在有氧条件下，每分子葡萄糖完全氧化时产生 36 分子 ATP。因而，厌氧细胞如要在单位重量、单位时间内产生与有氧条件下相同数量的 ATP，则需要消耗  $36/2 = 18$  倍的葡萄糖。

如向厌氧的以酵解方式高速利用葡萄糖的细胞悬浮液中通入氧气，则葡萄糖的消耗速度急剧下降，只相当于无氧速度的很小一部分。同时有氧时乳酸积聚(在无氧条件下乳酸大量堆积)几乎下降到零，因为呼吸使葡萄糖生成大量  $\text{CO}_2$  和  $\text{H}_2\text{O}$ ，故无乳酸堆积。这种葡萄糖的消耗受到抑制，乳酸的堆积终止，同时开始耗氧的现象叫做巴斯德效应。一百多年以前，巴斯德在研究酿酒发酵过程中发现了这个现象，但这是所有兼性细胞包括高等动物的细胞的共性。这是两种多酶体系调节和整合的特殊例子。

由巴斯德效应出现的第一个问题是：为什么耗氧一开始葡萄糖的消耗就减慢？我们曾经看到线粒体对 ADP 有很高的亲和力，当氧存在时，它们使 ADP 磷酸化，直至  $[\text{ATP}]/[\text{ADP}]$  比值升高为止。我们还看到，磷酸果糖激酶(一种变构酶)可以催化酵解过程中的一个调节反应，即将 6-磷酸果糖磷酸化而成 1, 6-二磷酸果糖。ADP 可以增强磷酸果糖激酶的活性，过量的 ATP 则抑制其活性。当  $[\text{ATP}]/[\text{ADP}]$  比值高时，磷酸果糖激酶的活性严重地受到抑制，反之，如果比值低，磷酸果糖激酶的活性便增强。因此氧化磷酸化引起的  $[\text{ATP}]/[\text{ADP}]$  比值升高，会使磷酸果糖激酶反应的速度大大减慢，也就降低酵解速率。测定从无氧条件转变成有氧条件的前后在完整细胞中葡萄糖、6-磷酸葡萄糖、6-磷酸果糖及其他酵解中间产物的浓度，证明这种机制确实存在于完整细胞，当需氧细胞缺氧时，6-磷酸葡萄糖和 6-磷酸果糖的浓度降低，1, 6-二磷酸果糖的浓度则升高，就是说，我们有了一个交叉点(Crossover point)。相反，当向厌氧细胞给氧时，细胞中 6-

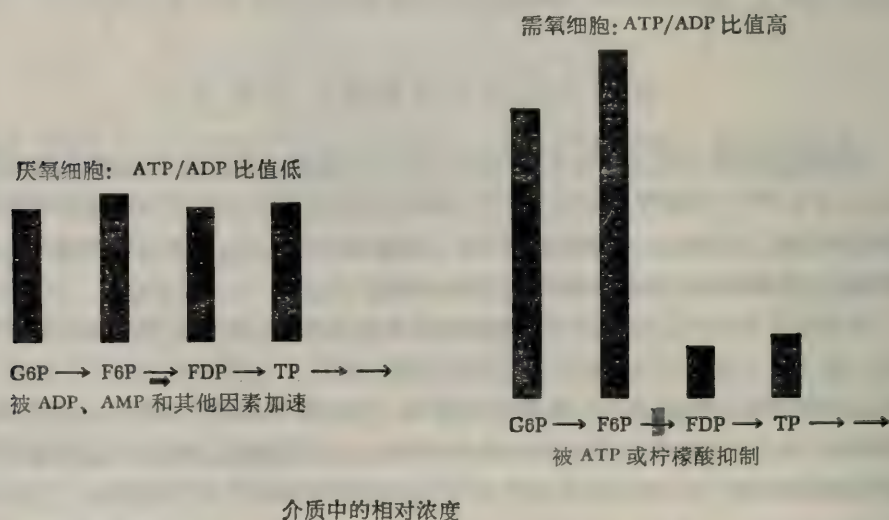


图 19-27 图示糖酵解的交叉点。表明酵解过程中某些中间产物的相对浓度：左图为厌氧细胞中磷酸果糖激酶变构活化时；右图为需氧细胞中磷酸果糖激酶受到变构抑制时。交叉点是指顺序中的一个点，若解除该点的抑制可使前面的中间产物降到它们的稳态浓度，该点后面的中间产物的浓度则升高。

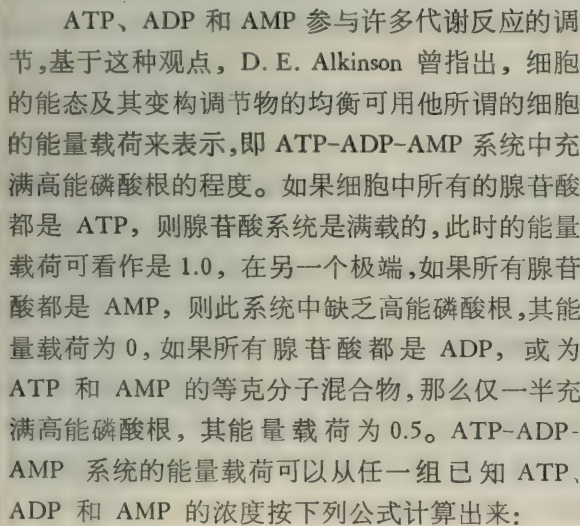
注解：G6P = 6-磷酸葡萄糖 F6P = 6-磷酸果糖 FDP = 二磷酸果糖 TP = 磷酸丙糖

磷酸葡萄糖和 6-磷酸果糖的浓度增加，而 1, 6-二磷酸果糖的浓度变得很低(图 19-27)。这些现象表明，磷酸果糖激酶步骤是有氧条件下对调节糖酵解速率真正起决定性作用的。



虽然由ATP和柠檬酸引起的磷酸果糖激酶的变构抑制作用是对巴斯德效应的主要调节机制,其它机制也起作用,在某些类型细胞中甚至还占优势。总之,酵解和呼吸速率的协调包括线粒体和胞汁隔室之间的密切相互作用,其中线粒体膜上的特殊运输系统起着中心作用。涉及到的一些主要调节机制总结于图 19-28。

我们已经看到 ATP 和 ADP 的浓度在糖酵解和呼吸的变构调节上是一个重要因素，我们还将看到这些核苷酸参与调节许多其它代谢反应的例子。而且 AMP 也是某些变构酶的重要调节物。某些生物合成反应中，ATP 断掉焦磷酸时就产生 AMP，通过腺苷酸激酶的作用，ADP 又可磷酸化而成 ATP：



Alkinson 曾指出,能量载荷是调节产生和利用高能磷酸根途径的主要因素。图 19-29

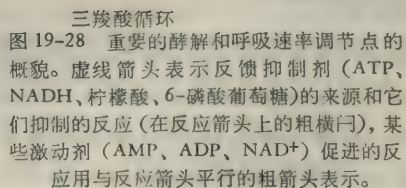


图 19-28 重要的酵解和呼吸速率调节节点的概貌。虚线箭头表示反馈抑制剂 (ATP、NADH、柠檬酸、6-磷酸葡萄糖) 的来源和它们抑制的反应 (在反应箭头上的粗横杠), 某些激动剂 (AMP、ADP、NAD<sup>+</sup>) 促进的反应与反应箭头平行的粗箭头表示。

中的曲线表示产生 ATP 的速率和利用 ATP 的代谢过程的速率是能量载荷的函数。在代谢稳定状态, ATP 的产生和利用是相等的, 即图中两条曲线的交叉处, 此时的能量载

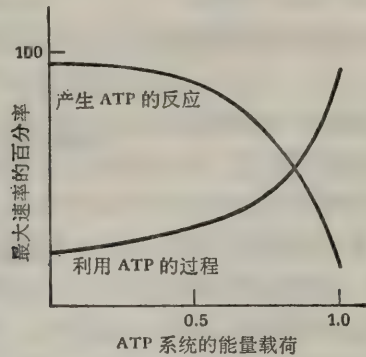


图 19-29 产生 ATP 和利用 ATP 的反应与 ATP 系统的能量载荷的关系

表 19-6 某些组织中腺苷酸的含量 (微克分子/克, 湿重)

组 织	ATP	ADP	AMP
豚 鼠 脑	2.98	0.70	0.13
大白鼠心脏	13.3	2.6	0.43
苍蝇肌肉	14.0	3.0	0.25

荷相当于 0.85。此值表示各种不同细胞在正常和禁食条件下, 腺苷酸系统的实际能量载荷(表 19-6)。如果能量载荷降低到 0.85 以下, 通过调节酶对 ATP、ADP、AMP 的相对浓度的反应使产生 ATP 的过程加快, 而利用 ATP 的反应则减慢。如果能量载荷超过了正常水平, 则发生相反的改变。因此 ATP-ADP-AMP 系统趋向于平衡得最好的稳定状态, 此时的能量载荷为 0.85, 并且强有力地抗拒任何偏移。

## 磷酸化势能

细胞能量状态的另一种表示方法是磷酸化势能:  $[ATP]/[ADP][P_i]$  比值, 这个比值相当于反应的质量作用常数  $\Gamma$ :



$$\Gamma = \frac{[ATP]}{[ADP][P_i]}$$

在没有能量来源的情况下,  $\Gamma$  值很低, 约为 5 微克分子<sup>-1</sup>(25℃)。实际观察到细胞中  $[ATP]/[ADP][P_i]$  比值要比这高些, 高过的程度可以作为衡量细胞利用 ATP 过程的指标。在热力学上, 磷酸化势能比能量载荷更为合适, 因为能量载荷未把无机磷的浓度考虑进去, 而磷酸则是氧化磷酸化和酵解磷酸化中必不可少的反应物。

与能量载荷相比, 磷酸化势能是细胞能量状态的一种更灵敏的指示剂。它的值可从细胞中 ATP、ADP 和磷酸的实际浓度计算得到, 变化范围为 200—800 M<sup>-1</sup>, 随代谢状态而定。磷酸化势能愈高, 细胞的能量化也愈高。另一方面, 能量载荷很少偏离 0.85。



## 摘 要

线粒体存在于所有需氧的真核细胞之中,是三羧酸循环反应、电子传递和氧化磷酸化作用的场所。线粒体含有光滑的外膜、内膜(内陷形成称为嵴的折叠)和富含蛋白质的基质。两层膜在化学组成、通透性以及酶含量上是不同的。电子传递和氧化磷酸化作用的酶类位于内膜,三羧酸循环的酶类大部分存在于基质之中。向完整线粒体补给底物、磷酸盐、ADP、 $Mg^{2+}$ 和氧使进行呼吸时,ADP的氧化磷酸化就能进行。P/O比值(每消耗一个氧原子时摄取的磷酸分子数)对与NAD相连的电子传递系统来说是3.0,或对与黄素相连的电子传递系统来说是2.0。ADP磷酸化时的能量升高,此能量来自电子从主要的电子供体(NADH或还原型黄素核苷酸)传递到氧分子时的自由能下降。已查明链中有三处是向磷酸化作用供能的部位:部位I,在NAD和泛醌之间;部位II,在细胞色素b和c之间,以及部位III,在细胞色素a和氧之间。磷酸盐和ADP是完整线粒体以最大速率进行电子传递时所必需的成分,缺乏ADP时,耗氧速率很低。受体调节比值是有ADP时的呼吸速率与无ADP时呼吸速率的比值。

称为解偶联剂的化合物(如2,4-二硝基苯酚)可以抑制磷酸化作用而不影响电子传递作用。第二类试剂(如寡霉素)既抑制电子传递作用,也抑制磷酸化作用。离子载体(与 $K^+$ 、 $Na^+$ 或其它阳离子形成络合物的抗菌素)也能抑制氧化磷酸化作用,这是因为电子传递产生的能量被用于运输阳离子了。氧化磷酸化作用显然是一个可逆过程,ATP能促进呼吸链中电子的反向传递。

关于氧化磷酸化作用的机制有三个主要假说,其主要区别在于它们所假定的使电子传递中氧化还原能量转变成ATP合成能量时的中间媒介物有所不同。化学偶联假说假定有一种以共价键结合的高能化合物形成,构象偶联假说设想有一个中间的高能构象状态存在,而化学渗透偶联假说与已知资料最相符合,它假定横跨内膜的 $H^+$ 离子的电化学梯度是偶联工具。

线粒体外膜允许大多数溶质自由通过,而线粒体内膜则不然。但内膜含有特殊运输系统,可运输磷酸、ADP、ATP、二羧酸、三羧酸、某些氨基酸和 $Ca^{2+}$ 离子。当这些溶质与电子传递时所产生的高能 $H^+$ 离子梯度偶联时,它们就可以逆浓度梯度而运输。

线粒体内膜上含有一些梭系成分,可以把胞汁中NADH的电子转移到线粒体的电子传递链上,或将线粒体内NADH的电子转移到胞汁。细胞质中糖酵解的速率和线粒体内的呼吸速率是由胞汁和线粒体内ATP、ADP及磷酸盐的浓度来整合的。呼吸作用抑制酵解作用主要受磷酸果糖激酶的变构抑制所左右。ATP-ADP-AMP系统的能量载荷(即被高能磷酸键充盈的程度)以及磷酸化势能( $[ATP]/[ADP][P_i]$ )可以表示细胞的能量状态。

## 参 考 文 献

也可参阅第十八章文献。这一领域的书目繁多,这里只能列出一些最重要的著作。

### 书籍

Kalekar, H., Biological Phosphorylations: Development of Concepts. Prentice-Hall, Englewood Cliffs N. J., 1969. Reprinted classical papers with comments by the editor.

- Kaplan, N. O., and E. P. Kennedy: *Current Aspects of Biochemical Energetics*, Fritz Lipmann Dedicatory Volume, Academic, New York, 1966.
- Lehninger, A. L.: *The Mitochondrion: Molecular Basis of Structure and Function*, Benjamin, Menlo Park, Calif., 1965.
- Mitchell, P.: *Chemiosmotic Coupling and Energy Transduction*, Glynn Research, Bodmin, England, 1968.

## 论文

- Boyer, P. D., R. L. Cross and W. Momsen: "A New Concept for Energy Coupling in Oxidative Phosphorylation Based on a Molecular Explanation of the Oxygen Exchange Reactions", *Proc. Natl. Acad. Sci. (U. S.)*, **70**: 2837—2839 (1973).
- Chance, B.: "The Nature of Electron Transfer and Energy-Coupling Reactions," *FEBS Lett.*, **23**: 3—19 (1972).
- Chappell, J. B.: "Systems Used for the Transport of Substances into Mitochondria," *Br. Med. Bull.*, **24**: 150—157 (1968).
- Greville, G. D.: "A Scrutiny of Mitchell's Chemiosmotic Hypothesis," *Curr. Top. Bioenerg.*, **3**: 1—78 (1969).
- Hackenbrock, C. R.: "Ultrastructural Bases for Metabolically Linked Mechanical Activity in Mitochondria; I: Reversible Ultrastructural Changes with Change in Metabolic Steady State in Isolated Liver Mitochondria," *J. Cell Biol.*, **30**: 269—297 (1966).
- Hackenbrock, C. R.: "Ultrastructural Bases for Metabolically Linked Mechanical Activity in Mitochondria; II: Electron Transport-Linked Ultrastructural Transformations in Mitochondria," *J. Cell Biol.*, **37**: 345—369 (1968).
- Harold, F. M.: "Conservation and Transformation of Energy by Bacterial Membranes," *Bact. Rev.*, **36**: 172 (1972).
- Klingenberg, M.: "Metabolite Transport in Mitochondria: An Example for Intracellular Membrane Function," *Essays Biochem.*, **6**: 119—159 (1970).
- Krebs, H. A.: "The Pasteur Effect and the Relations between Respiration and Fermentation," *Essays Biochem.*, **8**: 2—34 (1972).
- Lehninger, A. L.: "Mitochondria and  $\text{Ca}^{2+}$  Transport," *Biochem. J.*, **119**: 129—138 (1970).
- Mitchell, P.: "Cation-Translocating ATPase models," *FEBS Lett.*, **33**: 267—274 (1973).
- Mitchell, P.: "Chemiosmotic Coupling in Oxidative and Photosynthetic Phosphorylation," *Biol. Rev. Camb. Phil. Soc.*, **41**: 445—502 (1966).
- Palmer, J. M., and D. O. Hall: "The Mitochondrial Membrane System," *Prog. Biophys. Biophys. Chem.*, **24**: 125—176 (1972).
- Racker, E.: "The Two Faces of the Inner Mitochondrial Membrane," *Essays Biochem.*, **6**: 1—22 (1970).
- Senior, A. E.: "The Structure of Mitochondrial ATPase," *Biochim. Biophys. Acta*, **301**: 249—277 (1973).
- Skulachev, V.: "Energy Transformations in the Respiratory Chain," *Curr. Top. Bioenerg.*, **4**: 127—191 (1972). An important analysis of energy coupling.
- Slater, E. C.: "The Coupling between Energy-Yielding and Energy-Utilizing Reactions in Mitochondria," *Q. Rev. Biophys.*, **4**: 35—71 (1971).
- Wrigglesworth, J. M., L. Packer, and D. Branton: "Organization of Mitochondrial Structures as Revealed by Freeze-Etching," *Biochim. Biophys. Acta*, **205**: 125—135 (1970).

## 习题

- 写出线粒体外 NADH 经呼吸链被氧化成  $\text{NAD}^+$  的总方程式, 假设磷酸甘油梭系参与作用。
- 写出线粒体外 NADH 被氧化的相似方程式, 假设苹果酸-草酰醋酸梭系参与作用。
- 试计算下列过程中 P/O 比值的理论值。考虑 GTP 相当于 ATP:
  - 异柠檬酸→琥珀酸
  - $\alpha$ -酮戊二酸→琥珀酸(有二硝基苯酚存在)
  - 琥珀酸→草酰乙酸
  - 3-磷酸甘油醛→丙酮酸(有砷酸盐存在)



4. 写出如下物质在肝脏完全氧化成  $\text{CO}_2$  和  $\text{H}_2\text{O}$  时的平衡方程式，包括所有有关的磷酸化步骤，假设磷酸甘油-磷酸二羟丙酮梭系参与作用：(a) 甘油醛，(b) 丙酮酸，(c) 柠檬酸，(d) 延胡索酸，(e) 草酰乙酸。
5. 写出果糖在加有 2, 4-二硝基苯酚的典型细胞制备中完全氧化成  $\text{CO}_2$  和  $\text{H}_2\text{O}$  时的平衡方程式，包括全部有关的磷酸化步骤。
6. 计算在完整线粒体内琥珀酸被分子氧氧化成延胡索酸时以 ATP 形式贮存下来的能量效率的百分比。
7. 计算葡萄糖被分子氧氧化成  $\text{CO}_2$  和  $\text{H}_2\text{O}$  以 ATP 贮存下来的能量效率的百分比，假设由苹果酸-草酰乙酸梭系调节。
8. 测得离体灌流的大白鼠心肌在有氧和无氧条件下，无机磷和腺苷酸的浓度如下：

条 件	浓 度， 微 克 分 子			
	ATP	ADP	AMP	$\text{P}_i$
有 氧	4.2	0.8	0.06	1.5
无 氧	3.4	1.2	0.2	5.2

计算每种条件下的能量载荷和磷酸化势能。

【邓学思译 方暨岚校】

## 第二十章 脂肪酸的氧化

由于脂肪酸能够以三酰基甘油的形式大量储存在细胞内,所以脂肪酸作为富能燃料在高等动物和植物体内起着极为重要的作用。三酰基甘油含有高能量(约9千卡/克),而且可以几乎无水的形式作为细胞内的脂肪小滴而积聚,因此,特别适应于这种功能。相反地,糖原和淀粉只能产生约4千卡/克热,并且,由于它们高度水化而不能以如此浓缩的形式储存。在正常饮食下,人体所需总燃料的40%由脂肪酸提供。在饥饿或冬眠动物以及候鸟,脂肪酸实际上是唯一的能量来源。

本章将讨论脂肪酸氧化生成乙酰 CoA,然后乙酰 CoA 进入三羧酸循环的酶促反应途径,并将追踪脂肪酸氧化的重要中间产物酮体的生成和利用。

### 脂肪酸的来源

哺乳类动物组织正常只含有近乎没有的微量游离脂肪酸,事实上,脂肪酸有毒性。在受激素控制的脂肪酶的作用下,脂肪或脂肪组织中的三酰基甘油生成游离脂肪酸,然后游离脂肪酸从组织释放,与血清白蛋白紧密结合,并以这种形式经血液运到其他组织去进行氧化。以这种方式释出的脂肪酸,首先在细胞质内酶促“激活”,然后进入线粒体氧化。

在脊椎动物,除脑组织以外,几乎所有的组织都能将长链脂肪酸氧化成  $\text{CO}_2$  和  $\text{H}_2\text{O}$ 。但是在某种条件下,脑组织却能氧化脂肪酸分解代谢的中间产物  $\beta$ -羟丁酸。某些组织,例如心肌,其能量大部分来自脂肪酸氧化。脂肪酸的流通、分布以及氧化是和糖类燃料的利用统一的,两者都受复杂的内分泌调节。

### 脂肪酸氧化的途径

在十九世纪末叶以前,就已推测脂肪酸在细胞内的合成和降解是二碳断片的相加或相减,因为大多数天然脂肪酸具有偶数碳原子。这一概念也为早期的观察所支持,即在饥饿的哺乳类动物或在糖尿病病人中,脂肪酸氧化不完全,导致四碳酸,如乙酰乙酸和 D- $\beta$ -羟丁酸(图 20-1)在血、尿中积聚。另一证据来自 1904 年德国生物化学家 F. Knoop 的经典

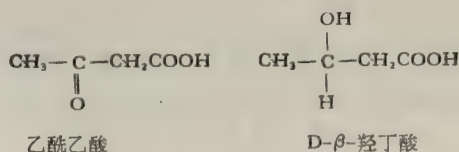


图 20-1 酮体

实验,他观察到家兔喂以在甲基末端( $\omega$ -碳)原子上标有苯基的偶数碳脂肪酸后,不论所喂脂肪酸的碳链长度如何,尿中都排出苯乙酸。另一方面,若喂以奇数碳脂肪酸的  $\omega$ -苯



基衍生物,则尿中排出苯甲酸(图 20-2)。(苯乙酸和苯甲酸在尿中以 D-葡萄糖醛酸酯的形式存在。)这些结果表明, $\omega$ -苯基脂肪酸是从羧基端开始逐步氧化移去二碳断片而降解的。

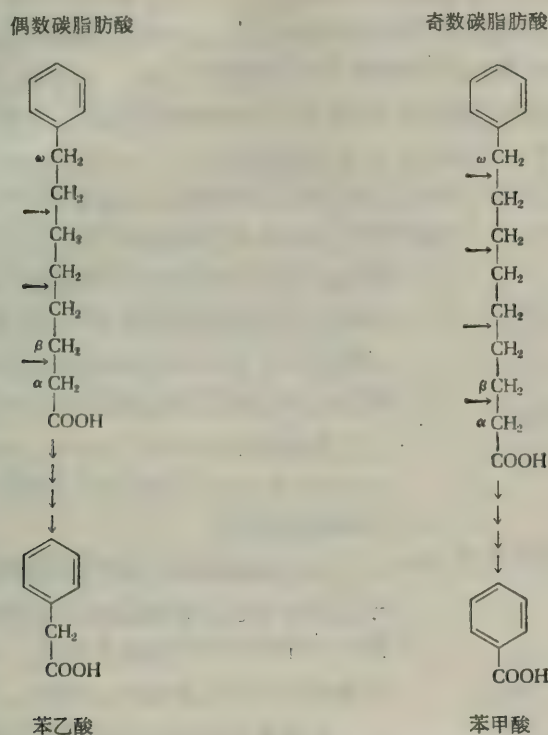


图 20-2 Knoop 的家兔  $\omega$ -苯基脂肪酸氧化实验。偶数碳脂肪酸总是生成苯乙酸；奇数碳脂肪酸总是生成苯甲酸为排泄的终末产物。他由此得出结论：氧化首先发生在  $\beta$ -碳原子上，然后在脂肪酸链的箭头所示部位相继断裂下二碳断片乙酸。

这些实验或许是第一次报道的代谢示踪物实验。Knoop 由此假设脂肪酸氧化是以  $\beta$  氧化方式进行的，即在  $\beta$  碳原子上氧化生成  $\beta$ -酮酸，再断裂形成乙酸和缩短了二个碳原子的脂肪酸。

然而，多年来为证明在动物组织的无细胞提取液中有脂肪酸氧化过程所作的努力未获成功，因此认为与脂肪酸氧化有关的酶类需要完整的细胞结构。1943 年，L. F. Leloir 和 J. M. Munoz 在阿根廷发现这一酶系统是极不稳定的。其后不久，A. L. Lehninger 在美国指出脂肪酸氧化需要 ATP，而且证明脂肪酸在羧基上酶促激活。他还发现脂肪酸氧化产生的二碳单位可以进入三羧酸循环。1948 年 E. P. Kennedy 和 Lehninger 指出，脂肪酸氧化只在线粒体内进行。

下一个重要线索来自德国 F. Lynen 及其同事们的研究，这使人们很快地认识了脂肪酸氧化的酶促反应步骤的特点。他们发现，依赖于 ATP 的脂肪酸激活过程包括脂肪酸与辅酶 A 的巯基酯化，生成脂酰辅酶 A 衍生物，随后脂肪酸氧化的所有步骤都是以其辅酶 A 硫酯的形式进行的。催化脂肪酸氧化各个步骤的各种酶类已经在 Lynen、D. E. Green、S. Ochoa，以及其他研究者的实验室中高度提纯。

## 脂肪酸氧化循环的概貌

来自胞汁的长链脂肪酸在氧化之前必须经过相当复杂的酶促激活,然后穿过线粒体膜转入大隔室,脂酰基转移给线粒体内的辅酶 A,生成脂酰辅酶 A 硫酯。脂酰辅酶 A 后来的氧化(如图 20-3 概要表示的)完全在线粒体基质内进行。脂酰辅酶 A 脱氢,即从  $\alpha$  和  $\beta$  碳原子上脱去一对氢原子,生成  $\alpha, \beta$ -或  $\Delta^2$ -未饱和脂酰辅酶 A。后者经酶促水化生成  $\beta$ -羟脂酰辅酶 A,再在下一步脱氢生成  $\beta$ -酮脂酰辅酶 A。 $\beta$ -酮脂酰辅酶 A 与第二分子辅酶 A 起反应而酶促断裂。一个产物是来自原来脂肪酸链 1、2 碳原子的乙酰辅酶 A。另一个产物是比原来的脂肪酸少两个碳原子的长链饱和脂酰辅酶 A,现在就成为下一轮迴反应的

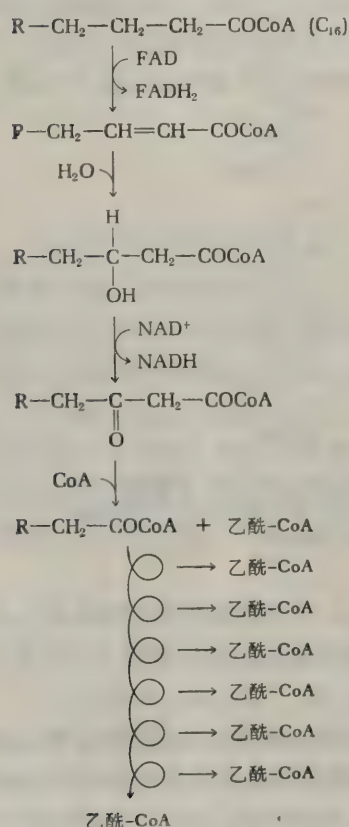


图 20-3 脂肪酸氧化螺旋。每经过一序列反应,移去 1 分子乙酰辅酶 A。1 分子棕榈酸 (C<sub>16</sub>) 激活成棕榈酰辅酶 A 后,产生 8 分子乙酰辅酶 A。

底物。每一轮迴都是从先脱氢开始,以移去第二个二碳断片乙酰辅酶 A 而告终(图 20-3)。经过这种螺旋式的反应,每一次脂肪酸链失去一个二碳断片乙酰辅酶 A。16 碳棕榈酸总共经过七次这种循环,产生 8 分子乙酰辅酶 A 和 14 对氢原子。棕榈酸只需最初激活一次,因为在每一轮迴之末,缩短了的脂肪酸已是辅酶 A 硫酯的形式。

脂肪酸脱氢时所脱下的氢原子进入呼吸链,在电子经由细胞色素系统递给分子氧的过程中,发生 ADP 转为 ATP 的氧化磷酸化作用。作为脂肪酸氧化系统产物而形成的乙酰辅酶 A 则进入三羧酸循环。

现在来详细介绍脂肪酸激活和氧化的每个酶促反应步骤。

### 脂肪酸的激活和进入线粒体

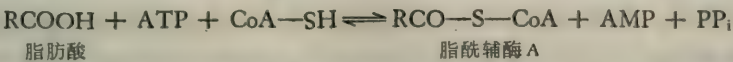
脂肪酸由线粒体外的细胞质进入线粒体有三个阶段:(1) 游离脂肪酸与线粒体外的辅酶 A 在 ATP 驱使下酶促酯化生成脂酰辅酶 A,这一步通常称为脂肪酸的激活;(2) 脂酰基从脂酰辅酶 A 转移到载体分子肉毒碱上,随后脂酰肉毒碱越过内膜;(3) 脂酰基从脂酰肉毒碱转移给线粒体内的辅酶 A,此过程发生在内膜的内表面上。

### 脂肪酸的激活

至少有三种不同的酶催化脂酰辅酶 A 硫酯的形成。每一种酶对一定长度范围的脂肪酸链具有特异性。这些酶称为脂酰辅酶 A 合成酶。乙酰辅酶 A 合成酶激活乙酸、丙酸和丙烯酸,中长链脂酰辅酶 A 合成酶激活具有 4—12 个碳原子的脂肪酸,长链脂酰辅酶 A 合成酶激活具有 12—22 个或更多个碳原子的脂肪酸。后二种酶既可激活饱和脂肪酸,又可激活未饱和脂肪酸以及 2-、3-羟酸。这三种合成酶均



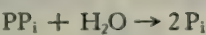
已高度提纯,它们的性质和机理很相似。需要 ATP 的脂酰辅酶 A 合成酶所催化的总反应式如下:



此反应中,在脂肪酸的羧基和辅酶 A 的巯基之间形成硫酯键,ATP 进行焦磷酸解裂生成 AMP 和无机焦磷酸 (PP<sub>i</sub>)。反应平衡显然偏向于脂酰辅酶 A 的形成,因为 ATP 水解生成 AMP 和 PP<sub>i</sub> 的标准自由能约为 -10.0 千卡,而乙酰辅酶 A 水解时的标准自由能约为 -7.52 千卡。

已经证明,在脂酰辅酶 A 合成酶的作用中有一种与酶结合的中间物,这是脂肪酸和 AMP 磷酸根的混合酐,脂酰腺苷酸(图 20-4)。它在酶的活性部位形成,同时释放焦磷酸入介质。而后结合的脂酰腺苷酸与辅酶 A 作用生成产物脂酰辅酶 A 和游离 AMP。已发现脂酰辅酶 A 合成酶存在于线粒体外膜和内质网中。

激活反应中形成的焦磷酸被无机焦磷酸酶水解生成无机正磷酸:



其真正的效应是利用 ATP 的两个高能键以激活 1 分子脂肪酸。在脂酰辅酶 A 合成酶反应中生成的另一产物 AMP 在腺苷酸激酶作用下再磷酸化生成 ADP:

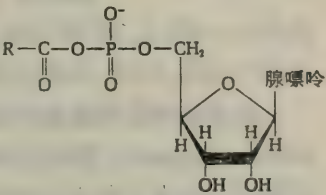


图 20-4 脂酰腺苷酸中间物的结构。

### 转移至肉毒碱

长链饱和脂肪酸以辅酶 A 硫酯的形式穿越线粒体内膜的能力是有限的,但肉毒碱可以大大促进它的透入。长期以来就知道肉毒碱存在于动物组织,直到发现它是某种甲虫幼虫 (*Tenebrio molitor*) 的重要生长因子之后,才认识到它的重要性。

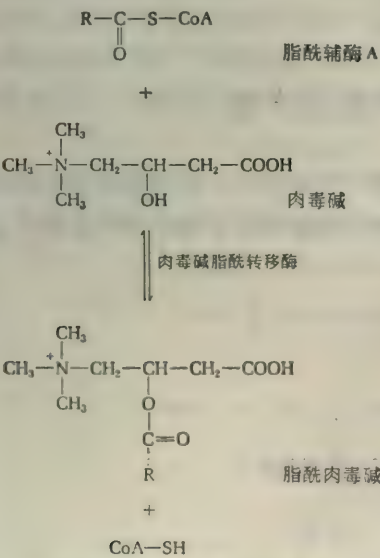


图 20-5 脂酰基转移到肉毒碱

I. B. Fritz 和其他研究者指出,肉毒碱促进脂肪酸氧化是由于肉毒碱脂酰转移酶的作用,该酶催化脂酰基从它与辅酶 A 形成的硫酯键转移到肉毒碱的羟基上形成氧酯键 (图 20-5)。由于这一反应的标准自由能变化十分小,所以脂酰肉毒碱键显然是一种高能键。然后这样形成的 O-脂酰肉毒碱酯透过内膜进入基质,这或许是通过一种特殊的运输系统而实现的。

### 转移至线粒体内的辅酶 A

透入过程的最后阶段,在位于内膜内表面上的第二型肉毒碱脂酰转移酶的作用下,酰基从肉毒碱转移到线粒体内辅酶 A 上:



这种复杂的常被称为脂肪酸梭的透入机制，具有隔开线粒体外和线粒体内的辅酶 A 池以及脂肪酸池的作用。此时线粒体内的脂酰辅酶 A 就成为在内部基质隔室中进行的脂肪酸氧化系统的底物了。

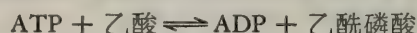
### 脂肪酸通过其它机制激活

线粒体含有参与脂肪酸激活的第二型脂酰辅酶 A 合成酶，它在线粒体基质内。这种酶需要 GTP 而不是 ATP，可以使 GTP 裂解出正磷酸。总反应由脂酰辅酶 A 合成酶 (GDP 形成) 催化：



在伴有  $\alpha$ -酮戊二酸氧化的底物水平磷酸化时，线粒体基质内产生 GTP，而这种酶能够利用所产生的 GTP 来激活线粒体中内生性的游离脂肪酸。

在某些能使短链脂肪酸发酵的微生物中，例如严格厌氧的库氏梭状芽孢杆菌 (*Clostridium kluyveri*)，脂酰辅酶 A 硫酯可经间接途径生成。第一步，ATP 直接使羧基磷酸化而形成乙酸或丁酸的高能脂酰磷酸，这分别由乙酸激酶或丁酸激酶催化：



这样形成的脂酰磷酸是羧酸和磷酸的混合酐 (图 20-6)。这和糖酵解时生成 3-磷酸甘油酸的情况相类似。上述反应是吸能反应，由于接着在磷酸脂酰转移酶催化下与辅酶 A 产生放能反应，故平衡移向右方。

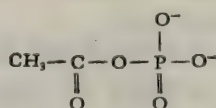


图 20-6 乙酰磷酸

### 脂肪酸氧化中的第一个脱氢步骤

在线粒体内脂酰辅酶 A 形成之后，随后脂肪酸氧化循环的各步反应都在线粒体内部隔室中进行。第一步，脂酰辅酶 A 硫酯在脂酰辅酶 A 脱氢酶催化下在  $\alpha$  和  $\beta$  碳原子上进

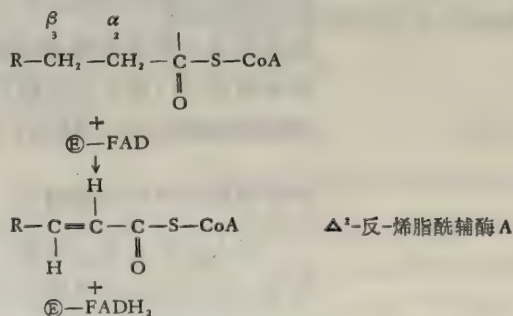


图 20-7 脂酰辅酶 A 脱氢酶反应。酶蛋白 (E) 以及与它紧密结合的黄素辅基作为一个单位起作用。



行酶促脱氢,生成产物  $\Delta^2$ -烯脂酰辅酶 A(图 20-7),双键位置用符号  $\Delta$  表示。在此反应中形成的  $\Delta^2$  双键是反型几何构型。然而,天然脂肪的不饱和脂肪酸的双键几乎都是顺型的;关于这点,我们以后再谈。

有四种不同的脂酰辅酶 A 脱氢酶,它们分别对一定长度范围的脂肪酸链有特异性,它们都含有与之紧密结合的辅基黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)。FAD 消耗了底物而还原,此过程可能是通过明显的单电子步骤而发生的。

还原型脂酰辅酶 A 脱氢酶的  $\text{FADH}_2$  不能直接与氧反应,而是通过第二种黄素蛋白,即电子转移黄素蛋白,将其电子递给呼吸链(图 20-8)。电子转移黄素蛋白又将电子递给呼吸链的某种载体,这种载体目前还不清楚,可能是辅酶 Q。

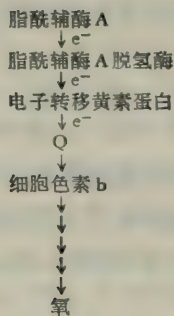


图 20-8 由脂酰辅酶 A 到氧的电子传递。(也可见图 18-14)

## 水 化 步 骤

$\Delta^2$ -反-烯脂酰辅酶 A 酯的双键在烯脂酰辅酶 A 水化酶的作用下水化,于是生成 3-羟脂酰辅酶 A,该酶已提制成结晶。催化反应式见图 20-9。水加合在  $\Delta^2$  反型双键两端上具有立体特异性,结果生成 3-羟脂酰辅酶 A 的 L-立体异构体。烯脂酰辅酶 A 水化酶既能水化  $\Delta^2$ -顺-不饱和脂酰辅酶 A 硫酯生成相应的 3-羟脂酰辅酶 A 的 D-立体异构体(图 20-9),又能水化  $\Delta^3$ -反-不饱和脂酰辅酶 A(见下面)。这种明显的无特异性似乎费

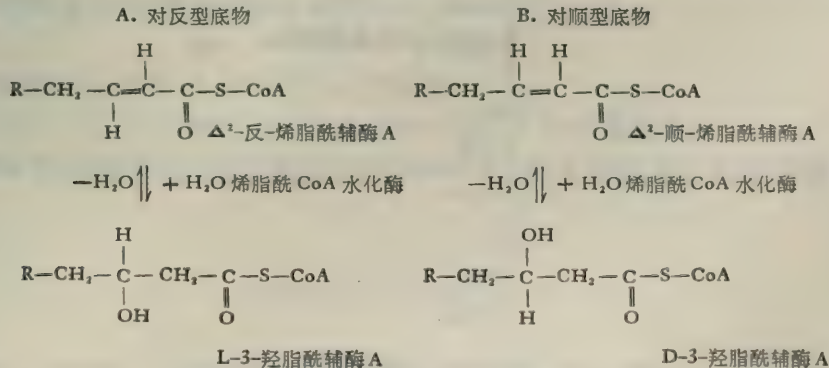


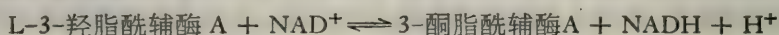
图 20-9  $\Delta^2$ -烯脂酰辅酶 A 水化酶的作用

解,因为脂肪酸氧化循环中的下一个酶对 3-羟脂酰辅酶 A 的 L-立体异构体具有绝对特异

性。以后我们会见到, 3-羟脂酰辅酶 A 的 L-和 D-立体异构体尽管来源和功能不同,但在脂肪酸代谢中都起作用。

## 第二个脱氢步骤

脂肪酸氧化循环的下一步是 L-3-羟脂酰辅酶 A 在 3-羟脂酰辅酶 A 脱氢酶作用下脱氢生成 3-酮脂酰辅酶 A (图 20-10),  $\text{NAD}^+$  是特异的电子受体。反应式为:



此酶对脂肪酸链的长度相对地无特异性,但对 L 型立体异构体则具有绝对特异性。反应中生成的  $\text{NADH}$  将其电子当量提供给线粒体呼吸链中的  $\text{NADH}$  脱氢酶。

## 裂解步骤

脂肪酸氧化循环的最后一步是在乙酰辅酶 A 乙酰基转移酶(通常称为硫解酶)的催化下, 3-酮脂酰辅酶 A 与 1 分子游离辅酶 A 相互作用断裂生成脂肪酸羧基端的二碳断片乙酰辅酶 A。剩下的缩短了二个碳原子的脂肪酸,则以其辅酶 A 硫酯的形式出现 (图 20-11)。

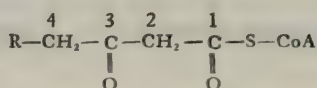


图 20-10 3-酮脂酰辅酶 A

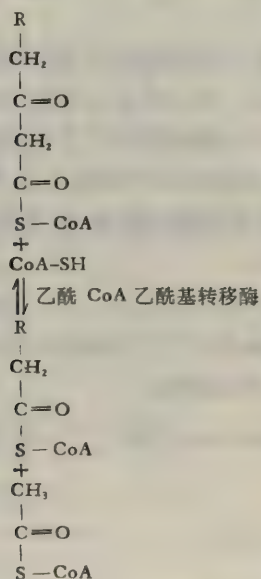


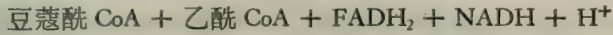
图 20-11 3-酮脂酰辅酶 A 的硫解

这种裂解反应又称硫解作用或加硫裂解,和水解作用相似。因为反应大量放能,所以有利于断裂。看来这种酶有两(或三)种,各自对不同长度的脂肪酸链有特异性。



## 平 衡 表

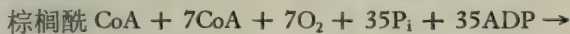
上面已经述及一个轮迴的脂肪酸氧化循环。在每一轮迴中，从起始的长链脂酰辅酶 A 分子上脱下 1 分子乙酰辅酶 A 和两对氢原子。若从棕榈酰辅酶 A 开始，氧化循环一轮迴，其总反应式是：



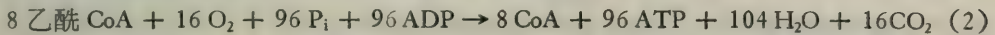
现在，我们可将 1 分子棕榈酰辅酶 A 经过 7 次轮迴生成 8 分子乙酰辅酶 A 的反应式列写为：



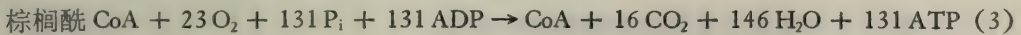
每分子  $\text{FADH}_2$  在辅酶 Q 阶段向呼吸链提供一对电子当量，因此当电子转移给氧时产生 2 分子 ATP。同样，每分子 NADH 被呼吸链氧化结果生成 3 分子 ATP。因此，每断裂 1 分子乙酰辅酶 A，通过氧化磷酸化共产生 5 分子 ATP。所以，我们可将包括氧化磷酸化作用在内的反应式写成：



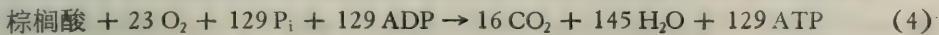
在脂肪酸循环中生成的 8 分子乙酰辅酶 A 可以进入三羧酸循环。下列反应式代表它们的氧化作用和相偶联的磷酸化作用的平衡关系：



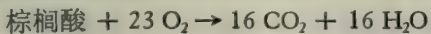
联合 (1)、(2) 式，得到总反应式为：



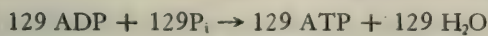
由于从棕榈酸生成棕榈酰辅酶 A 时实际上用掉 2 分子 ATP，故 1 分子棕榈酸净生成的 ATP 是 129 分子。因此，棕榈酸氧化的总反应式是：



放能过程和吸能过程的分反应式是：



$$\Delta G^{\circ} = -2340 \text{ 千卡/克分子}$$



$$\Delta G^{\circ} = 129 \times 7.30 = +942 \text{ 千卡/克分子}$$

因此，棕榈酸氧化的标准自由能中大约有  $942/2340 \times 100 = 40\%$  作为高能磷酸而回收。

## 平衡代谢总反应式

很多的生化内容可以归纳成一个代谢过程的总平衡反应式。总结一个代谢序列中每一组步骤的平衡反应式，常常是麻烦又花费时间的。这里介绍另一种方法，是在许多情况下都能提供方便的一条捷径。

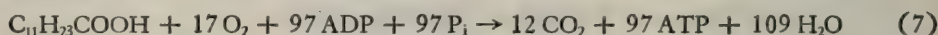
假设我们想要写出在典型细胞内月桂酸（12 碳饱和脂肪酸）完全燃烧生成  $\text{CO}_2$  和  $\text{H}_2\text{O}$  并包括有关的磷酸化反应在内的总反应式。那么我们先写出在不伴有偶联磷酸化反应（例如发生在一个炸弹量热器中）时月桂酸燃烧的化学反应式，并平衡之：



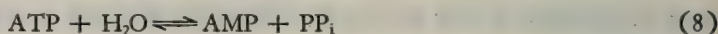
然后将涉及 ATP 生成的反应加进这个方程式。月桂酸裂解为 6 分子乙酰辅酶 A，有 5 个引起  $\text{FADH}_2$  生成的步骤，每步产生 2 ATP，共 10 ATP；有 5 个引起 NADH 生成的步骤，每步产生 3 ATP，共 15 ATP。总数是 25 ATP。所产生的 6 分子乙酰辅酶 A 的乙酰基完全燃烧要经过六个轮迴三羧酸循环，产生  $6 \times 12 \text{ATP} = 72 \text{ATP}$ 。因此，总共生成 97 ATP。可以写出它们生成的平衡反应式：



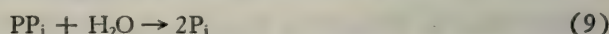
(5) 式加 (6) 式，得：



月桂酸转变为月桂酰辅酶 A 时，有 1 分子 ATP 转为 AMP 和  $\text{PP}_i$ ：



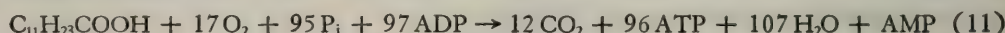
(8) 式中产生的  $\text{PP}_i$  在焦磷酸酶作用下转变为两个  $\text{P}_i$



(8) 式加 (9) 式，得：



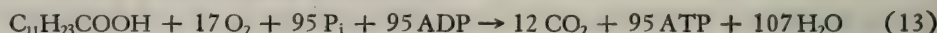
(7) 式加 (10) 式，得：



AMP 在腺苷酸激酶作用下，消耗 ATP 而磷酸化生成 ADP：



(11) 式加 (12) 式便成为月桂酸燃烧的总反应式：



总共消耗了 34 个氧原子。关于这点，计算如后。在月桂酰辅酶 A 断裂成 6 个乙酰辅酶 A 时产生的 5 个还原型黄素蛋白再氧化需要 5 个氧原子。在月桂酰辅酶 A 断裂成 6 个乙酰辅酶 A 时产生的 5 个 NADH 再氧化需要 5 个氧原子。6 个乙酰辅酶 A 氧化时三羧酸循环 6 次轮迴所生成的还原型电子载体再氧化需要 24 个氧原子。总共是 34 个氧原子或 17 个氧分子。

要注意到，在脂肪酸完全燃烧时产生大量水，其中大部分来自伴随的磷酸化反应。这一事实具有一定的生物学意义，因为它可以解释为什么某些动物能够从储存脂肪获得燃料和水。在骆驼的驼峰里，水就是以这种途径以脂肪形式储存着。

## 不饱和脂肪酸的氧化

不饱和脂肪酸，例如油酸的氧化途径和饱和脂肪酸相同，但出现两个特殊问题。天然不饱和脂肪酸的双键是顺式构型，而饱和脂肪酸氧化的中间产物  $\Delta^2$ -不饱和脂酰辅酶 A 是反式构型。此外，大多数不饱和脂肪酸，当从它羧基端逐步移去二碳断片时，其双键在碳链中所处的位置，使脂肪酸循环的正常中间产物是  $\Delta^3$ -不饱和脂酰辅酶 A，而不是  $\Delta^2$ -



脂酰辅酶 A。这将在图 20-12 油酸氧化图解中表示之。

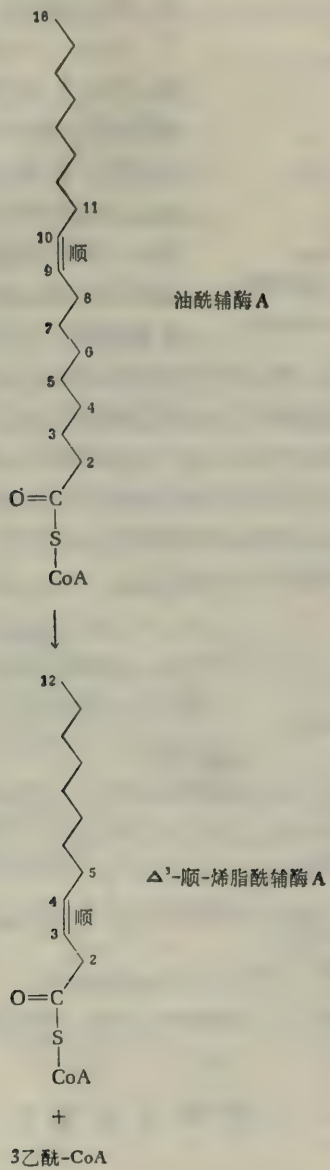


图 20-12 从油酸氧化移去 3 分子乙酰辅酶 A，生成 Δ<sup>3</sup>-顺-烯脂酰辅酶 A。

这些问题由于发现了一种叫做烯脂酰辅酶 A 异构酶的辅助酶而得以解决，此酶催化双键由 Δ<sup>3</sup>-顺式转为 Δ<sup>2</sup>-反式构型的可逆变化（图 20-13）。所形成的 Δ<sup>2</sup>-反-不饱和脂酰辅酶 A 是脂肪酸氧化程序中下一个酶，烯脂酰辅酶 A 水化酶的正常底物，此酶使它水化生成 L-3-羟脂酰辅酶 A（见上述）。因此，油酰辅酶 A 经脂肪酸氧化循环完全氧化生成 9 个乙酰辅酶 A，除了饱和脂肪酸氧化各步骤所需的酶类以外，还要一个由烯脂酰辅酶 A 异构酶催化的酶促反应步骤。

亚油酸等多烯脂肪酸由于含有 2 个以上顺式双键，需要第二种辅助酶才能完成其氧

化过程。亚油酰辅酶 A 逐步断去 3 个乙酰辅酶 A, 保留  $\Delta^3$ -顺式双键, 就像油酰辅酶 A 一样 (图 20-14)。在上述烯脂酰辅酶 A 异构酶作用下, 转为  $\Delta^2$ -反式异构体, 再经过通常的反应步骤, 失去 2 个乙酰辅酶 A, 剩下一个 8 碳  $\Delta^2$ -不饱和脂肪酸 (图 20-14)。注意后者的双键仍然是顺式构型。虽然  $\Delta^2$ -顺式双键可以被烯脂酰水化酶水化, 但其产物是 3-羟脂酰辅酶 A 的 D 型立体异构体, 而不是像饱和脂肪酸氧化时那样生成 L 型立体异构体。在利用 D 型立体异构体时需要第二个辅助酶, 3-羟脂酰辅酶 A 差向异构酶, 该酶催化第 3 碳原子差向变构形成 L 型异构体 (图 20-14)。这一可逆反应的产物再被具有 L-特异性的 3-羟脂酰辅酶 A 脱氢酶氧化, 并被硫解酶断裂, 以完成氧化循环。来自亚油酸的剩余 6 碳饱和脂酰辅酶 A 再氧化生成 3 分子乙酰辅酶 A。脂肪酸氧化循环中, 这两个辅助酶使天然脂类中已发现的所有不饱和脂肪酸都得以完全氧化。不饱和脂肪酸完全氧化时产生的 ATP 分子数目比相应的饱和脂肪酸氧化时为少, 因为不饱和脂肪酸含有氢原子较少, 因此通过呼吸链递给氧的电子亦较少。

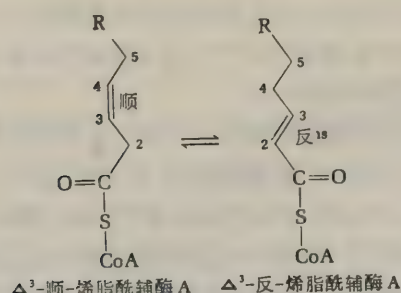


图 20-13 烯脂酰辅酶 A 异构酶催化的反应

化第 3 碳原子差向变构形成 L 型异构体 (图 20-14)。这一可逆反应的产物再被具有 L-特异性的 3-羟脂酰辅酶 A 脱氢酶氧化, 并被硫解酶断裂, 以完成氧化循环。来自亚油酸的剩余 6 碳饱和脂酰辅酶 A 再氧化生成 3 分子乙酰辅酶 A。脂肪酸氧化循环中, 这两个辅助酶使天然脂类中已发现的所有不饱和脂肪酸都得以完全氧化。不饱和脂肪酸完全氧化时产生的 ATP 分子数目比相应的饱和脂肪酸氧化时为少, 因为不饱和脂肪酸含有氢原子较少, 因此通过呼吸链递给氧的电子亦较少。

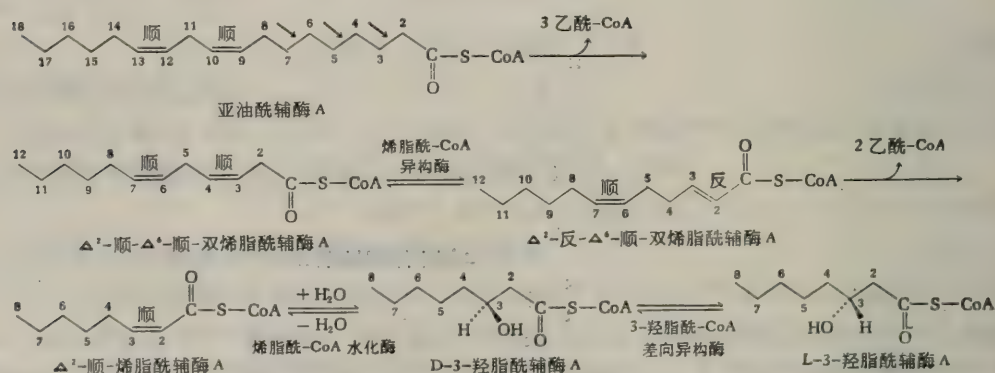
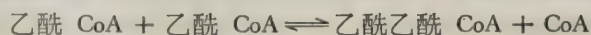


图 20-14 亚油酸的氧化途径, 表明辅助酶的作用。

## 酮体及其氧化

许多脊椎动物的肝脏能够将来自脂肪酸或丙酮酸氧化所生成的过多的乙酰辅酶 A 转化为游离乙酰乙酸和 D- $\beta$ -羟丁酸, 它们经血液运输到肝外组织进入三羧酸循环氧化。这些化合物 (图 20-1) 和丙酮一起, 统称为酮体。游离乙酰乙酸由乙酰乙酰辅酶 A 生成, 是其它酮体的主要来源。有些乙酰乙酰辅酶 A 来自长链脂肪酸在线粒体基质内氧化移去连续的乙酰辅酶 A 残基后剩下的最后 4 个碳原子。但是大多数在肝内生成的乙酰乙酰辅酶 A 是由脂肪酸氧化所产生的乙酰辅酶 A, 在乙酰辅酶 A 酰基转移酶作用下, 2 分子乙酰辅酶 A 首尾缩合而成:



这些反应中所生成的乙酰乙酰辅酶 A 在线粒体基质内从特殊途径再脱去辅酶 A 生成游离



乙酰乙酸。此过程叫做脱酰作用,包括  $\beta$ -羟- $\beta$ -甲基戊二酰辅酶 A 的酶促生成和断裂(图 20-15)。中间产物  $\beta$ -羟- $\beta$ -甲基戊二酰辅酶 A 也是固醇类的前身物。图 20-15 中的二步反应可总合为:

乙酰乙酰 CoA + H<sub>2</sub>O  $\rightleftharpoons$  乙酰乙酸 + CoA  
 这样产生的游离乙酰乙酸,在位于线粒体内膜与 NAD 相连的 D- $\beta$ -羟丁酸脱氢酶催化下,还原成 D- $\beta$ -羟丁酸。此酶对游离的 D 型立体异构体是特异的,它不能还原 D- $\beta$ -羟丁酸辅酶 A:

乙酰乙酸 + NADH + H<sup>+</sup>  $\rightleftharpoons$  D- $\beta$ -羟丁酸 + NAD<sup>+</sup>  
 这些反应中生成的游离乙酰乙酸和  $\beta$ -羟丁酸的混合物可以扩散出肝细胞,进入血流运至肝外组织。正常情况下,血中酮体浓度很低;但在饥饿或糖尿病时,可达很高水平。这种状态称为酮病,是由于肝内酮体生成速度超过肝外组织利用能力,以致酮体在血中聚积所致。

在肝外组织中, D- $\beta$ -羟丁酸氧化成乙酰乙酸,再从琥珀酰辅酶 A 接受辅酶 A 而激活(图 20-16)。所需的琥珀酰辅酶 A 来自  $\alpha$ -酮戊二酸氧化。在肝外组织中通过这些反应生成的乙酰乙酰辅酶 A 再进行硫解断裂成 2 分子乙酰辅酶 A,然后进入三羧酸循环。

虽然  $\beta$ -羟丁酸能在所有组织中经三羧酸循环而被利用,但是在某些情形下它在脑组织中的利用特别值得注意。正常时,脑组织几乎全部以葡萄糖作为燃料。然而当长期饥饿,葡萄糖的供给受到限制时,脑组织可以利用肝内脂肪酸产生的  $\beta$ -羟丁酸作为其主要的氧化燃料。 $\beta$ -羟丁酸通过上述反应转变为乙酰辅酶 A,而后进入三羧酸循环。

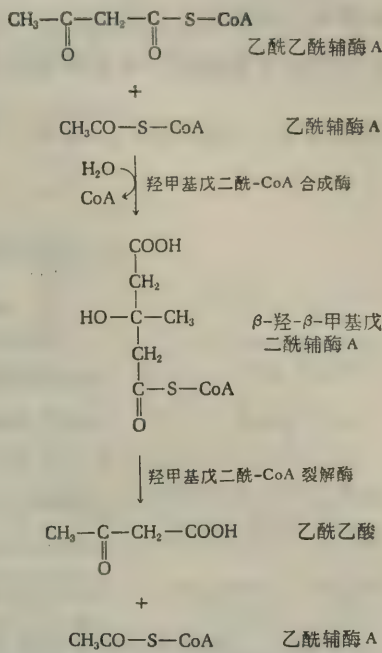


图 20-15 乙酰乙酰辅酶 A 脱酰作用

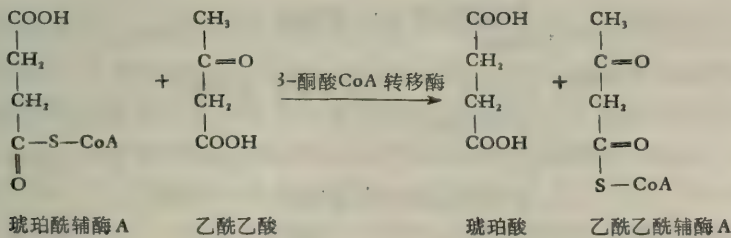


图 20-16 辅酶 A 从琥珀酰辅酶 A 转移到乙酰乙酸

### 奇数碳脂肪酸的氧化和丙酰辅酶 A 的去向

奇数碳脂肪酸很少见,但在某些海洋生物机体中可以出现。奇数碳脂肪酸也能在脂肪酸氧化循环中氧化。乙酰辅酶 A 残基逐个断去,直至剩下末端 3 碳残基丙酰辅酶 A 为止。在缬氨酸和异亮氨酸氧化降解时,也有丙酰辅酶 A 生成。此物由丙酰辅酶 A 羧化酶催化,在 ATP 参与下,羧化生成 D<sub>3</sub>-甲基丙二酰辅酶 A(图 20-17)。丙酰辅酶 A 羧化酶

以生物素为其辅基。在下一步中,  $D_s$ -甲基丙二酰辅酶 A 受甲基丙二酰辅酶 A 消旋酶的作用差向变构生成  $L_R$ -甲基丙二酰辅酶 A (图 20-18)。再下一步,  $L_R$ -甲基丙二酰辅酶 A 在甲基丙二酰辅酶 A 变位酶作用下异构化为琥珀酰辅酶 A, 而后再经琥珀酰辅酶 A 合成酶反应的逆过程脱酰生成游离琥珀酸, 后者是三羧酸循环的中间产物。

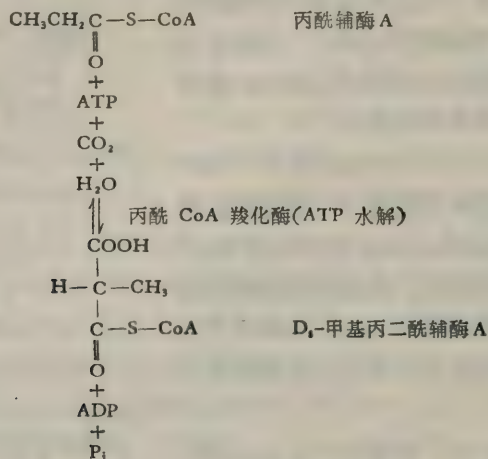


图 20-17 丙酰辅酶 A 的羧化作用

甲基丙二酰辅酶 A 变位酶需要辅酶  $B_{12}$  作为辅助因子。用同位素示踪法研究这种分子内反应, 证明整个  $-\text{CO}-\text{S}-\text{CoA}$  基从甲基丙二酰辅酶 A 的第 2 碳原子转移到甲基碳原子上, 而与 1 个氢原子相换。

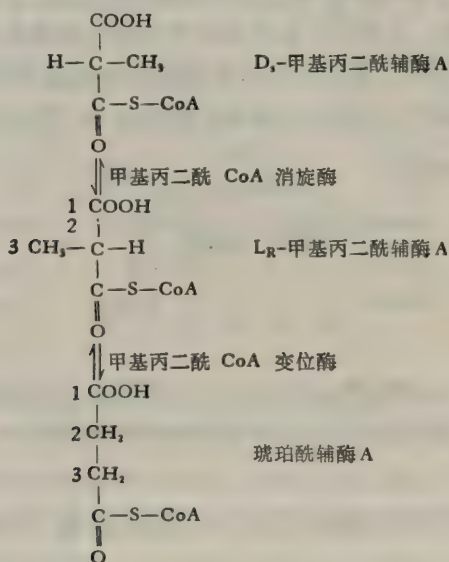


图 20-18 甲基丙二酰辅酶 A 的消旋作用及其转变为琥珀酰辅酶 A。注意在后一反应中整个  $-\text{C}-\text{S}-\text{CoA}$  基由第 2 碳原子转移到甲基碳原子上。



恶性贫血患者由于缺乏内在因子而缺少维生素  $B_{12}$ , 尿中排出大量甲基丙二酸及其前





不饱和脂肪酸需要额外的酶促步骤,为了(1)使它们的双键移换到能进行水化的适当位置上,以及(2)生成 3-羟基中间产物的 L 立体异构体。酮体乙酰乙酸和  $\beta$ -羟丁酸是在肝内由于乙酰乙酰辅酶 A 脱酰而生成。它们被运至其它组织,变为乙酰辅酶 A,并经三羧酸循环而氧化。奇数碳脂肪酸氧化为乙酰辅酶 A 和丙酰辅酶 A。丙酰辅酶 A 羧化生成甲基丙二酰辅酶 A,再异构化形成琥珀酰辅酶 A。 $\alpha$  羟化和  $\omega$  氧化是动物体内脂肪酸代谢的次要途径。在植物,长链脂肪酸  $\alpha$  氧化生成脂肪醛,再还原成脂肪醇。脂肪醇是植物蜡的成分。

## 参 考 文 献

### 书籍

- Dawson, R. M. C., and D. N. Rhodes (eds.): *Metabolism and Physiological Significance of Lipids*, Wiley, New York, 1964.
- Florkin, M., and E. H. Stotz (eds.): *Lipid Metabolism*, vol. 18 of *Comprehensive Biochemistry*, American Elsevier, New York, 1967.
- Hofmann, K.: *Fatty Acid Metabolism in Microorganisms*, Wiley, New York, 1963. The occurrence and metabolism of branched and cyclic acids.
- Stanbury, J. B., J. B. Wyngaarden, and D. S. Fredrickson (ed.): *The Metabolic Basis of Inherited Disease*, 3d ed., McGraw-Hill, New York, 1972. Chapter 22 has an excellent account of disorders of propionate metabolism.

### 论文

- Barness, L. A.: "Methylmalonic Acid," *Pediatrics*, 51: 1012—1018 (1973).
- Fritz, I. B.: "Carnitine and Its Role in Fatty Acid Metabolism," *Adv. Lipid Res.*, 1: 285—334 (1963).
- Fulco, A. J.: "Metabolic Alterations of Fatty Acids," *Ann. Rev. Biochem.*, 43: 147—168 (1974).
- Garland, P. B.: "Control of Citrate Synthesis in Mitochondria," in T. W. Goodwin (ed.), *Metabolic Roles of Citrate*, Academic, New York, 1968. Short review of relationships between fatty acid oxidation and the tricarboxylic acid cycle.
- Greville, G. D., and P. K. Tubbs: "The Catabolism of Long-Chain Fatty Acids in Mammalian Tissues," *Essays Biochem.*, 4: 155—212 (1968). Excellent and readable review.
- Krebs, H. A.: "The Regulation of Release of Ketone Bodies by the Liver," *Adv. Enzyme Regul.*, 4: 339—354 (1966).
- Kusunose, M., E. Kusunose, and M. J. Coon: "Enzymatic  $\omega$ -Oxidation of Fatty Acids," *J. Biol. Chem.*, 239: 1374—1380 (1964).
- Sokoloff, L.: "Metabolism of Ketone Bodies by the Brain," *Ann. Rev. Med.*, 24: 271—288 (1973).
- Stumpf, P. K.: "Metabolism of Fatty Acids," *Ann. Rev. Biochem.*, 38: 159—212 (1969).

## 习 题

1. 写出下列代谢过程的平衡反应式,包括全部激活步骤和全部氧化磷酸化作用。假定反应是在肝脏、肾脏或心脏内进行,并且有草酰乙酸便于利用。

- (a) 豆蔻酸氧化至乙酰辅酶 A
- (b) 花生四烯酸氧化至  $\text{CO}_2$  和  $\text{H}_2\text{O}$
- (c) 棕榈酸氧化至乙酰乙酸
- (d) 一油酰二棕榈酰甘油氧化至  $\text{CO}_2$  和水
- (e) 正壬酸氧化至  $\text{CO}_2$  和水

2. 假如第 7 位碳原子上标记了  $^{14}\text{C}$  的正壬酸在有二羧酸循环运转的情形下氧化,那么下列中间产物的哪个碳原子受标记最快:(1)琥珀酸,(2)草酰乙酸,(3) $\alpha$ -酮戊二酸?

3. 将第 2 位碳原子上标记了  $^{14}\text{C}$  的丙酮酸和肝组织一起培养。 $\beta$ -羟- $\beta$ -甲基戊二酰辅酶 A 的哪个碳原子迅速被标记?

[孙秀泓译 方暨岚校]



## 第二十一章 氨基酸的氧化降解

在高等动物,氨基酸是蛋白质的基本结构,也是其他许多重要生物分子,如激素、嘌呤、嘧啶、卟啉和一些维生素的前身物。但也可用作能量来源,特别是当氨基酸的进食量超过机体蛋白质更新所需时是这样。氨基酸用作燃料时先脱去氨基,余下的碳骨架有两条主要去路:(1)在糖原异生过程中变为葡萄糖或(2)经三羧酸循环氧化为  $\text{CO}_2$ 。哺乳类氨基酸变为葡萄糖要先经酶促作用变成葡萄糖合成直接途径上的中间产物,如丙酮酸或三羧酸循环中的二羧酸中间产物。自然,转变为葡萄糖的这部分氨基酸最终也将进入三羧酸循环彻底氧化。

脊椎动物既积极氧化来自食物蛋白质的外源性氨基酸,也积极氧化机体蛋白质代谢转化产生的内源性氨基酸。根据同位素示踪物实验计算,一个 70 公斤重的人,进食普通饮食,每日约更新蛋白质 400 克。其中四分之一氧化降解转变为葡萄糖,每日由外源性摄取所补充;其余的四分之三则进行再循环。每日有 6—20 克从氨基酸的氨基衍生的氮以含氮化合物(主要是尿素)的形式由尿排出。即使不吃蛋白质,人体每日仍排 5 克氮,相当于每日丧失内源性蛋白质 30 克以上。

另一方面,在多数细菌,氨基酸的氧化降解不是主要的过程。通常细菌进行氨基酸的生物合成比降解更活跃,特别在细菌迅速生长时是这样。不过某些细菌能降解氨基酸,特别是在氨基酸成了碳的唯一来源时。高等植物氨基酸代谢的总方向一般也是合成而不是氧化降解,因为植物通常总是不停地生长着的。

本章描述脊椎动物将作为蛋白质基本单位的 20 种氨基酸氧化降解为三羧酸循环的燃料乙酰 CoA,以及丙酮酸和葡萄糖的其他前身物的过程。我们还将讨论由氨基酸的氨基衍生出特殊的含氮废物即尿素、氨和尿酸的形成。

动物对各种氨基酸的利用率和比例决定于许多因素,包括(1)其他燃料的利用情况;(2)外源氨基酸的利用情况;(3)有机体在蛋白质合成中对氨基酸的需要;(4)有机体对必需氨基酸在营养上的依赖性和(5)对特异氨基酸作为其他重要生物分子的前身物的需要。

### 蛋白质水解作用

脊椎动物摄入的氨基酸,其主要的形式是蛋白质,由于氨基酸只能以游离的形式进入代谢途径,因此蛋白质和肽类首先在胃肠道被蛋白酶水解。这些酶由胃、胰和小肠分泌。

蛋白质的消化在胃内开始。胃内主要的蛋白酶是胃蛋白酶(分子量 33,000)。胃蛋白酶以酶原——胃蛋白酶原(分子量 40,000)的形式由胃粘膜的主细胞分泌。在胃液的酸性 pH 下,胃蛋白酶原被胃蛋白酶本身转变成具有活性的胃蛋白酶。此时从其单条多肽链的 N-末端释放出 42 个氨基酸残基。胃蛋白酶的特异性很广,但优先分解包含芳香族氨基酸残基的以及蛋氨酸和亮氨酸残基的肽键,产生肽类和小量游离氨基酸。

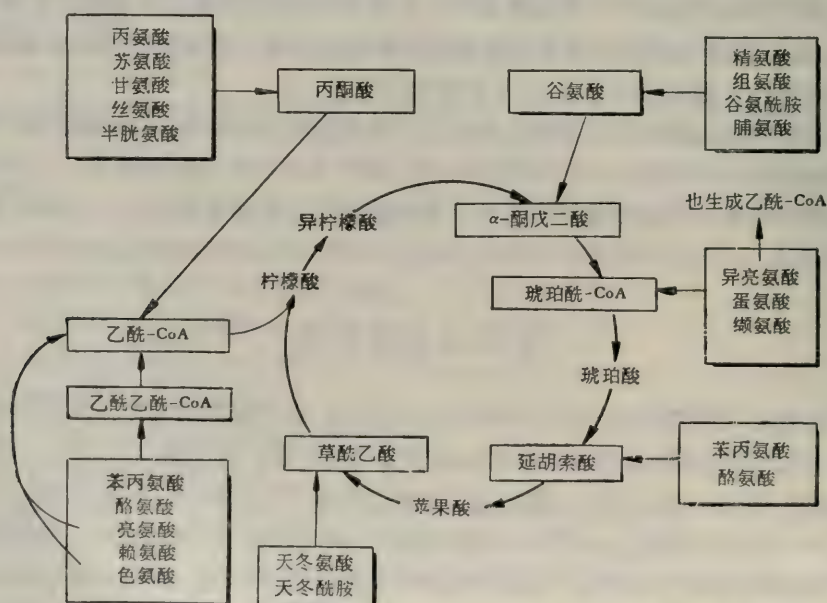
分泌入小肠的胰液提供酶原,如糜蛋白酶原、胰蛋白酶原、羧基肽酶原 A 及 B 和弹性蛋白酶原。糜蛋白酶原(分子量 24,000)在游离胰蛋白酶和糜蛋白酶的作用下去除两个二肽转变成活性糜蛋白酶。糜蛋白酶水解含有芳香族氨基酸羧基的肽键。胰蛋白酶原(分子量 24,000)在蛋白酶——肠激酶的作用下除去 N-末端六肽而转化为有活性的胰蛋白酶。胰蛋白酶水解含有精氨酸和赖氨酸的羧基的肽键。羧基肽酶 A(分子量 34,000)是一种含  $Zn^{++}$  的酶,水解几乎所有类型的羧基末端肽键,而羧基肽酶 B 则裂解 C-末端精氨酸或赖氨酸残基。

由于胃内胃蛋白酶的作用,继之以胰蛋白酶的作用,蛋白质被转化为短肽和游离氨基酸。然后这些残存的短肽被小肠粘膜所分泌的肽酶完全降解成游离氨基酸,尤其是亮氨酸氨基肽酶,另一个含  $Zn^{++}$  的酶能将肽类的 N-末端残基除去,所产生的游离氨基酸被吸收入血,并到达肝脏。氨基酸的许多进一步代谢,包括它的降解在内,都在肝内进行。

内源性蛋白质被用作燃料之前也必须先降解为氨基酸。但是关于细胞内蛋白质水解的机制知道得很少。在某些组织,特别是肝脏,这种水解的速度很高,与体蛋白代谢的周转有关。

## 氨基酸氧化过程图解

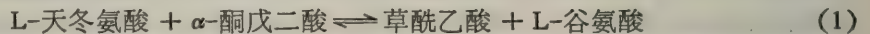
在脊椎动物,蛋白质的 20 种不同的氨基酸通过 20 种不同的多酶序列进行氧化降解,最后集中到少数几条途径变成丙酮酸、乙酰 CoA 或三羧酸循环的中间产物。如图 21-1 所示,其中有 11 种氨基酸的碳骨架直接或通过丙酮酸、或乙酰乙酰 CoA 最后变为乙酰 CoA,5 种变为  $\alpha$ -酮戊二酸,3 种变为琥珀酰 CoA,2 种变为草酰乙酸。苯丙氨酸和酪氨酸这两种氨基酸则经过降解,一部分碳骨架以乙酰 CoA 的方式,另一部分以延胡索酸的方式进



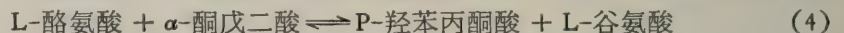
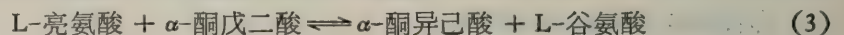
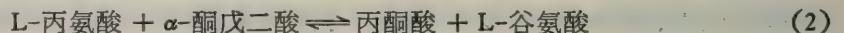


在氨基酸氧化降解过程中,从氨基酸脱下来的 $\alpha$ -氨基氮原子最终都自尿排出,在脊椎动物,其形式是尿素、氨或尿酸,依种族而异。但在所有脊椎动物, $\alpha$ -氨基从各种氨基酸脱下并最终变成上述二种终产物之一的酶促机制则是相似的。由于脱 $\alpha$ -氨基是大多数氨基酸分解代谢的第一个步骤,因此,我们将首先研究与此有关的两个主要的酶促途径:即转氨作用和氧化脱氨作用。

酸、赖氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、酪氨酸和缬氨酸)的 $\alpha$ -氨基是在分解代谢过程中通过转氨作用脱出的。在这类反应中, $\alpha$ -氨基转移到 $\alpha$ -酮酸(多数场合是 $\alpha$ -酮戊二酸)的 $\alpha$ -碳原子上,留下与该氨基酸相应的 $\alpha$ -酮酸,并使 $\alpha$ -酮戊二酸氨基化为L-谷氨酸(图 21-2)。催化这些反应的酶统称为转氨酶。大量的转氨酶现已弄清。多数要求 $\alpha$ -酮戊二酸作为氨基受体;因此这些转氨酶对 $\alpha$ -酮戊二酸-L-谷氨酸底物对具有特异性。对其他底物对的特异性并不严格,然而通常对一个底物对的活性最强,而酶就根据它来命名。例如,动物组织中一个突出的转氨酶是天冬氨酸氨基转移酶(图 21-2),更常称为天冬氨酸转氨酶,它催化下列可逆反应



虽然在前进方向上此酶以天冬氨酸作为氨基供体的活性最大,但是它也接受一些其他的 $\alpha$ -氨基酸作为供体。除天冬氨酸转氨酶以外,动物组织还含有需要 $\alpha$ -酮戊二酸作为氨基受体的其它转氨酶,如丙氨酸转氨酶,亮氨酸转氨酶和酪氨酸转氨酶,分别催化:



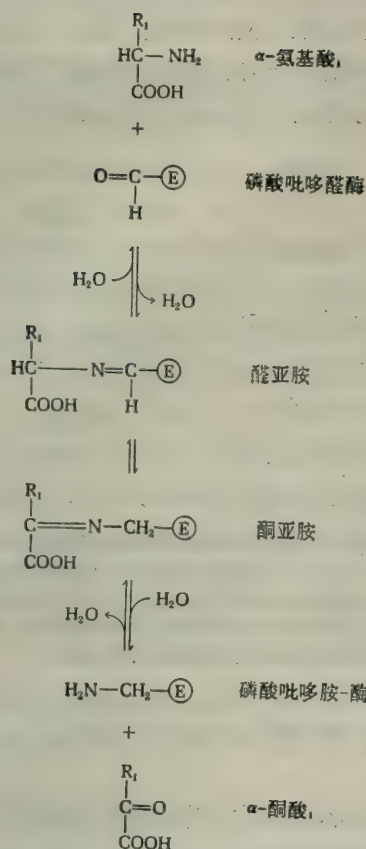
转氨酶所催化的反应是完全可逆的,平衡常数约为 1.0。虽然它们可以朝任一方向进行,但这里所说的是氨基酸的氧化降解,因此如反应式(1)至(4)那样,以 $\alpha$ -酮戊二酸作为氨基-受体来书写转氨酶反应是适当的。在转氨酶的作用下,不同氨基酸的氨基都只以一种 $\alpha$ -氨基酸,通常是谷氨酸的形式收集起来。这种收集氨基的方式是分解代谢途径中会聚现象的又一例。大多数转氨作用的终产物——谷氨酸于是又成了最后反应系列中的特异性氨基供体,在这些反应中,谷氨酸的氨基转化成含氮排泄产物。

转氨酶存在于真核细胞的线粒体和胞汁中。猪心的线粒体内和线粒体外的天冬氨酸转氨酶,其等电点 pH 和氨基酸成分互不相同。两种形式的分子量均约为 90,000,两者都含有大小差不多一样的两个亚基。在哺乳类动物,从其他氨基酸收集氨基是在胞汁内进行,由胞汁型天冬氨酸转氨酶所催化,生成谷氨酸。所形成的谷氨酸于是通过一个特殊的膜运输系统进入线粒体基质。在线粒体的基质中,谷氨酸或则直接脱氨基,或则在线粒体天冬氨酸转氨酶的作用下成为草酰乙酸的氨基供体而生成天冬氨酸。后者是尿素形成中氨基的直接供体之一(见下文)。

所有转氨酶看来都有一个相同的辅基——磷酸吡哆醛,并参与同一反应机制。这个结合很紧的磷酸吡哆醛大概是通过带电的环氮原子,以非共价键与酶蛋白质结合,起着氨基载体的作用。在它的催化循环中,它可逆地转变在其游离醛形式(磷酸吡哆醛)及胺化形式(磷酸吡哆胺)之间(图 21-3)。在这一循环中,氨基供体的非质子化的 $\alpha$ -氨基与酶-结合磷酸吡哆醛的醛基碳原子共价结合,除去水形成醛亚胺。醛亚胺互变异构成为相应的酮亚胺。醛亚胺和酮亚胺都含有 Schiff 氏碱所特有的  $\text{>C=N-}$  结构。加水形成游离 $\alpha$ -酮酸和辅基的胺化形式磷酸吡哆胺。于是磷酸吡哆胺-酶复合物与进入的 $\alpha$ -酮酸形成 Schiff 氏碱。通过上述步骤的逆转,将氨基供给 $\alpha$ -酮酸,再生成磷酸吡哆醛(图 21-3)。这样,辅基通过在醛和胺两种形式之间来回变动,将氨基从氨基酸交给酮酸,起着氨基载体的作用。转氨反应是一个双置换反应的例子,并表现出相应的乒乓动力学模式。



第一步



第二步

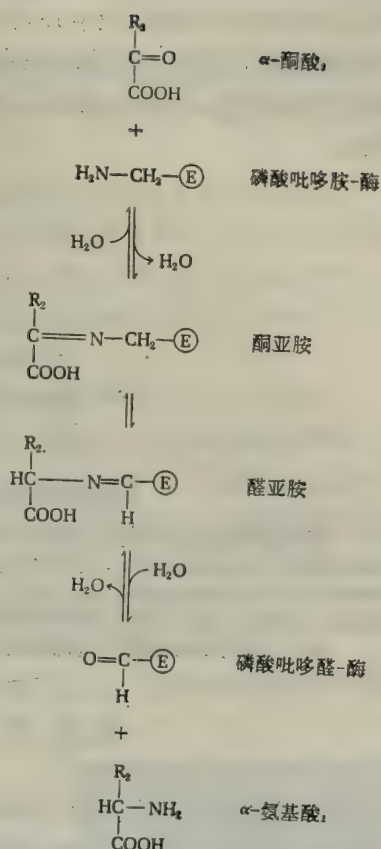


图 21-3 转氨酶反应的中间步骤。用  $H-C(=O)-E$  代表磷酸吡哆醛-酶复合体，以  $H_2N-CH_2-E$  代表磷酸吡哆胺-酶复合体。磷酸吡哆醛和磷酸吡哆胺的结构见前面；磷酸吡哆醛辅基是氨基酸与酮酸之间的中间氨基载体。

在游离的酶中，磷酸吡哆醛不单是通过环氮结合，而且也通过酶蛋白的特定赖氨酸残基上的  $\epsilon$ -氨基结合形成 Schiff 氏碱。进入的氨基酸底物从磷酸吡哆醛置换了酶的赖氨酸  $\epsilon$ -氨基，形成了底物-磷酸吡哆醛亚胺（图 21-4）。磷酸吡哆醛具有特殊的吸收光谱，可用以跟踪酶-底物中间复合物形成与消失的过程。

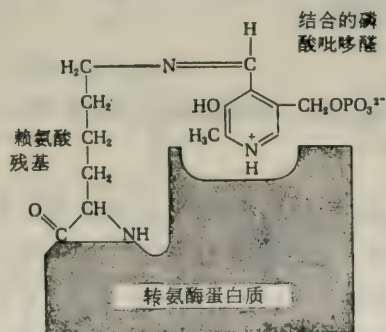
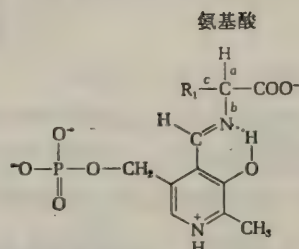


图 21-4 磷酸吡哆醛辅基与转氨酶蛋白的异性赖氨酸残基上的  $\epsilon$ -氨基之间的醛亚胺连接。酶与进入的  $\alpha$ -氨基酸起反应。 $\alpha$ -氨基酸从它的醛亚胺磷酸吡哆醛的连接置换出赖氨酸残基。

磷酸吡哆醛不单是转氨反应中的辅基,而且还是  $\alpha$ -氨基酸酶促脱羧、丝氨酸脱水、半胱氨酸脱硫以及在酶促外消旋反应中 L-与 D-氨基酸互变的辅酶。图 21-5 的分子式为这一事实的机制提供了基础。氨基酸和辅基之间形成一中间复合物与酶所提供的一种收回电子的结构一起,可使 a、b 和 c 键(图 21-5)变得不稳定,致使氨基酸分子容易进行多种类型的转换。

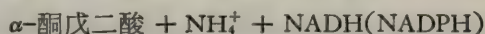
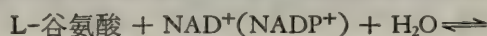


磷酸吡哆醛和氨基酸的 Schiff 氏碱

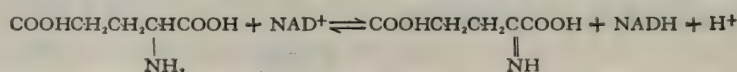
图 21-5 磷酸吡哆醛酶催化部位上的假设的中间产物。当氨基酸与磷酸吡哆醛起反应时,一对电子自氨基酸向带正电的吡啶环移动。在第二阶段,这些电子就自磷酸吡哆胺流向  $\alpha$ -酮酸受体。这样辅酶的作用就不单是氨基的载体,而且也是电子对的载体,使供体氨基酸的  $\alpha$ -碳原子氧化,而使受体酮酸的  $\alpha$ -碳原子还原。不同的磷酸吡哆醛酶促进不同的  $\alpha$ -氨基酸反应,包括转氨作用、脱羧作用、 $\beta$ -羟氨基酸脱水、 $\alpha$ -氨基酸的外消旋作用,如自半胱氨酸脱下硫化氢。

## 氧化脱氮作用

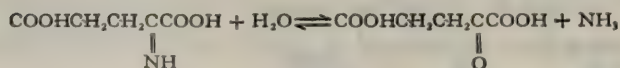
连接吡啶的谷氨酸脱氢酶存在于肝的胞汁和线粒体中。它催化转氨酶作用下所产生的谷氨酸迅速氧化脱氮,这样从其他氨基酸收集来的



氨基就以  $\text{NH}_4^+$  离子的形式脱下来。注意必须脱氢才能生成  $\alpha$ -酮酸;简单地水解只能除去氨基生成  $\alpha$ -羟酸而不是  $\alpha$ -酮酸。据认为,谷氨酸脱氢酶反应的第一个步骤是通过脱氢形成  $\alpha$ -亚胺基谷氨酸,随后亚胺基酸水解为酮酸,根据这些反应, L-谷氨酸脱氢酶可利用  $\text{NAD}^+$  或  $\text{NADP}^+$



$\alpha$ -亚胺基谷氨酸

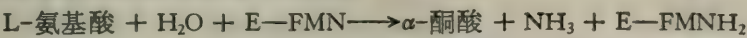


作为电子受体,但  $\text{NAD}^+$  优先被利用。所形成的  $\text{NADH}$  最终为电子传递链所氧化。在氨基酸的脱氮基作用中 L-谷氨酸脱氢酶起重要的作用,因为在大多数有机体中只有谷氨酸是具有这种活性脱氢酶的氨基酸。牛肝的谷氨酸脱氢酶分子量为 336,000,含有六个相同的亚基,其氨基酸序列已确定。它是一种变构酶,为特殊的调节物 ATP、GTP 和  $\text{NADH}$  所抑制,为 ADP、GDP 和某些氨基酸所激活。其活性亦受甲状腺激素(甲状腺



素)和某些类固醇激素所影响。谷氨酸脱氢酶倾向于可逆地联合成2至3兆道尔顿的杆状多聚体。

许多有机体含有结合黄素的氨基酸氧化酶,它亦能催化氨基酸的氧化脱氨作用,但它们的作用较小,认为不是氨基代谢的主流部分。有一种酶,即L-氨基酸氧化酶对L-氨基酸的脱氨作用有特异性并能促进下列反应



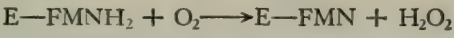
L-氨基酸氧化酶含有一个紧密结合的 FMN 作为辅基,并且存在于肝和肾的内质网中,在此它大概起着使赖氨酸脱氨的作用。L-氨基酸氧化酶大量存在于某些蛇毒中。

另一种在氧化脱氨反应中起作用的黄酶是D-氨基酸氧化酶,这种酶存在于肝和肾内,能催化D-氨基酸的氧化,再变成相应的 $\alpha$ -酮酸:

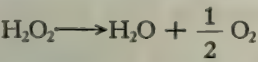


D-氨基酸氧化酶含有 FAD 作为辅基。它的功能大概是发动 D-氨基酸的降解。D-氨基酸来自小肠细菌细胞壁肽聚糖的酶解过程。这些小肠细菌含有 D-谷氨酸和其他 D-氨基酸。

L-和D-氨基酸氧化酶的还原形式能直接与氧分子反应,产生过氧化氢,并使酶再变为氧化形式:



联接黄素的氧化酶的这些和其他一些特性在别处论述。过氧化氢则在过氧化氢酶(一种含血红素的酶)的作用下分解为水和氧:



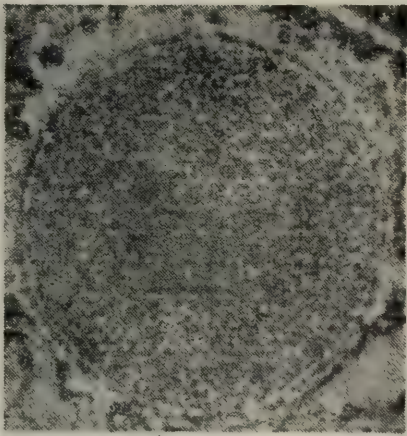
在真核细胞中,L-和D-两种氨基酸氧化酶以及尿酸氧化酶均局限在微体中。微体可视为特殊化的氧化细胞器。它们也含有过氧化氢酶。由氧化酶产生的过氧化氢就是由此酶催化分解的。因此微体又称为过氧化物体。图21-6表示肝微体的电镜照片。

以重要的转氨作用和氧化脱氨过程的观察为背景,我们现在讨论20种常见氨基酸的降解途径。

### 生成乙酰 CoA 的途径

图21-1表示20种不同的氨基酸的碳骨架得以进入三羧酸循环的门径。在下面的图表中,各氨基酸的途径根据进入三羧酸循环的地点来划分,并以一系列代谢图表示之。对这20条途径中的酶和中间产物不准备一一详细讨论。但对其机制和生物学特性有意义的反应将着重加以讨论。

进入三羧酸循环的主要地点是通过乙酰 CoA,有11种氨基酸由此进入。其中五种(丙氨酸、甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸和半胱氨酸)通过丙酮酸降解为乙酰 CoA,五种(苯丙氨酸、



0.25 微米  
图21-6 大鼠肝细胞中的微体(过氧化物体)。注意其单层包膜。微体中央呈规则的类似晶格的结构,由结晶的尿酸氧化酶所组成。

酪氨酸、亮氨酸、赖氨酸和色氨酸)通过乙酰乙酰 CoA 降解为乙酰 CoA, 两种(苏氨酸和亮氨酸)直接产生乙酰 CoA——苏氨酸产生 2 分子乙酰 CoA, 其一通过丙酮酸, 另一直接产生乙酰 CoA。亮氨酸和色氨酸既产生乙酰乙酰 CoA 亦产生乙酰 CoA 作为终产物。

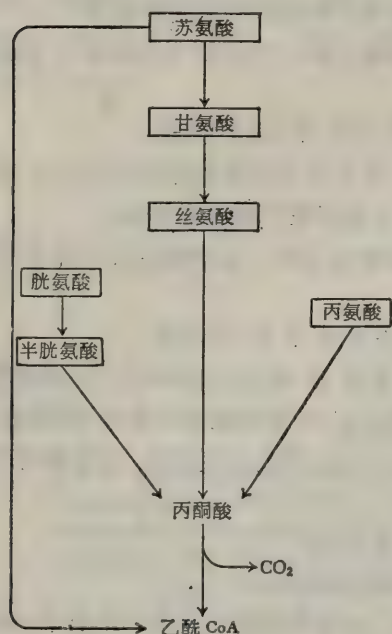


图 21-7 通过丙酮酸转化为乙酰 CoA 的途径

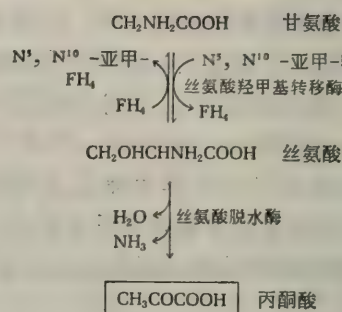
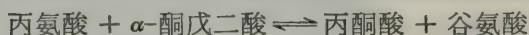


图 21-8 甘氨酸经丝氨酸转变为丙酮酸, 这是一条次要的途径。丝氨酸羟甲基转移酶对苏氨酸亦起作用。

### 到丙酮酸的途径(丙氨酸、甘氨酸、丝氨酸和半胱氨酸)

四种形成丙酮酸的氨基酸或则转化为葡萄糖因而属生糖氨基酸, 或则经三羧酸循环氧化(图 21-7)。

丙氨酸与  $\alpha$ -酮戊二酸转换氨基直接生成丙酮酸:



甘氨酸有两种降解途径。主要的途径并不生成乙酰 CoA, 而是在甘氨酸合成酶的作用下可逆地氧化裂解成为  $\text{CO}_2$ 、氨和  $\text{N}^5, \text{N}^{10}$ -亚甲四氢叶酸:



此处  $\text{FH}_4$  代表四氢叶酸。甘氨酸也可由丝氨酸羟甲基转移酶(一种磷酸吡哆醛酶)转化为丝氨酸。丝氨酸又由丝氨酸脱水酶(也是一种磷酸吡哆醛酶)脱水 and 脱去氨基成为丙酮酸(图 21-8)。注意丝氨酸也可通过丝氨酸羟甲基转移酶的逆作用降解为甘氨酸和  $\text{N}^5, \text{N}^{10}$ -亚甲四氢叶酸。这在细胞内的情况下是可逆的。

如图 21-9 所示, 半胱氨酸至少可有三种不同的降解途径, 取决于最后的含硫产物的性质。半胱氨酸经半胱氨酸亚磺酸转变为丙酮酸(图 21-9)。这一过程受一种含磷酸吡哆醛的酶所催化。

### 到乙酰乙酰 CoA 的途径(苯丙氨酸、酪氨酸、亮氨酸、赖氨酸和色氨酸)

取道乙酰乙酰 CoA 并由此到乙酰 CoA 的氨基酸有苯丙氨酸、酪氨酸、亮氨酸、赖氨酸和色氨酸(图 21-10)。苯丙氨酸和酪氨酸的降解步骤见图 21-11。两者都是生酮氨基酸,



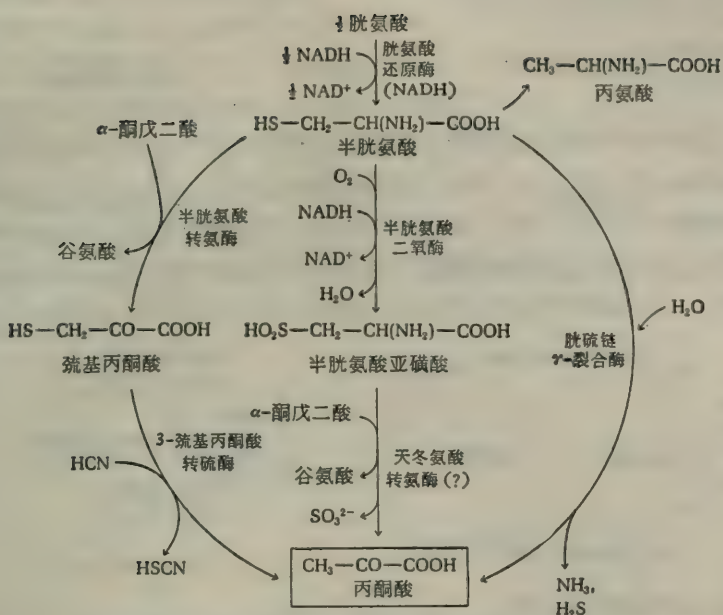


图 21-9 胱氨酸和半胱氨酸转变为丙酮酸。在不同的有机体此途径各有差异。

因为它们生成游离的乙酰乙酸。后者在消耗琥珀酰 CoA 的情况下被激活, 形成乙酰乙酰 CoA。这两个氨基酸余下的五个碳原子中有一个碳原子经中间产物 P-羟苯丙酮酸的氧化脱羧作用变为  $\text{CO}_2$ 。酪氨酸和苯丙氨酸的其他四个碳原子则以三羧酸循环的中间产物——延胡索酸回收。因此这两种氨基酸既是生酮又是生糖氨基酸。

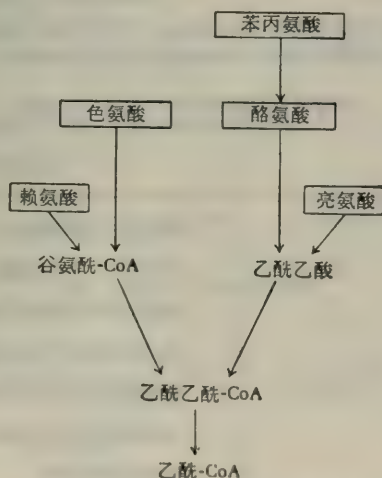
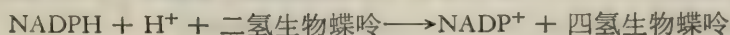


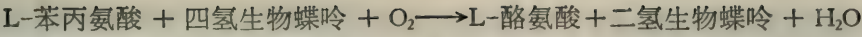
图 21-10 经乙酰乙酰 CoA 至乙酰 CoA 的途径

在苯丙氨酸-酪氨酸途径中,有几个酶值得特别一提。苯丙氨酸 4-单氧酶,又称苯丙氨酸羟化酶是单氧酶或混合功能加氧酶的代表。它将分子氧中的一个氧原子加入苯丙氨酸,生成 P-羟基;而另一个氧原子则还原成水。还原剂是 NADPH, 反应分两步进行:









在此反应中电子供体是四氢生物蝶呤,即二氢生物蝶呤的还原形式(图 21-12),后者是一种与叶酸有关的还原蝶啶衍生物。四氢生物蝶呤的作用是作为辅酶从 NADPH (最终电子供体)将还原当量带到电子受体 ( $\text{O}_2$  的一个氧原子)。

在人类,大约每一万人当中有一人由于隐性突变型基因而缺乏苯丙氨酸 4- 单氧酶。由于缺乏这种酶使正常时很少使用的苯丙氨酸代谢的第二途径起作用。在这一次要途径中,苯丙氨酸与  $\alpha$ -酮戊二酸进行转氨作用生成苯丙酮酸。苯丙酮酸在血内积蓄,随尿排泄。在童年时期,循环的过量苯丙酮酸妨碍脑的正常发育,造成严重的智力发育迟缓。这种情况即苯酮尿症 (常称为 PKU),是人类最早认识的代谢遗传性缺陷之一;童年时期限

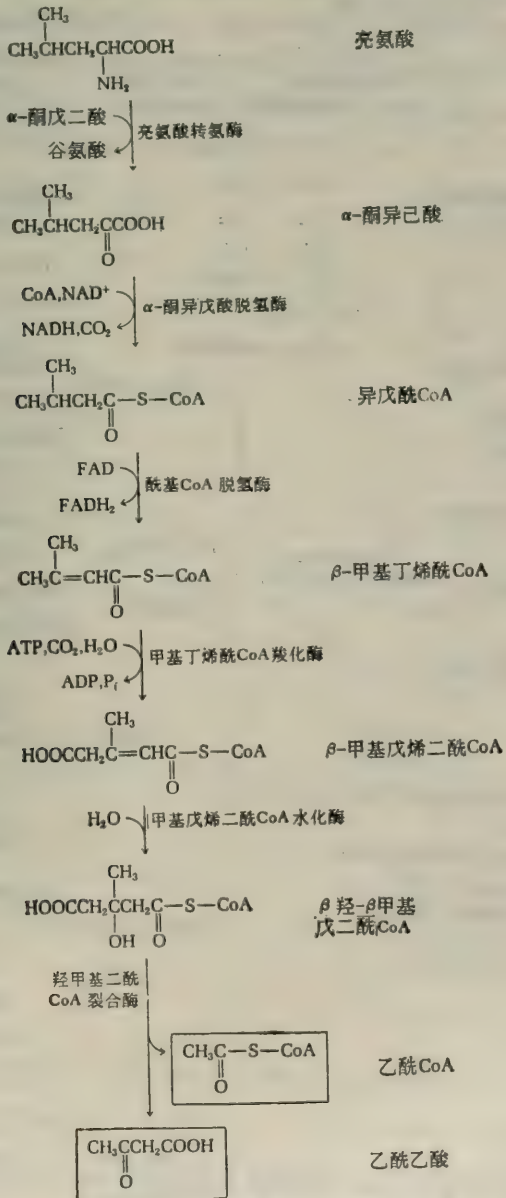


图 21-13 亮氨酸转变成乙酰 CoA 和乙酰乙酸

制食物中的苯丙氨酸可防止智力发育不全。人类中已经发现了许多其他的氨基酸代谢遗传性缺陷(表 21-1)。

催化羟苯丙酮酸氧化为尿黑酸(图 21-11)的 4-羟苯丙酮酸二氧酶含铜。这一氧化步骤十分复杂,包括苯环的羟化以及侧链的脱羧、氧化和移位。第二步由尿黑酸 1, 2-二氧酶所催化。这是一种需要还原型谷胱甘肽的 Fe(II) 酶;其反应机制也是很复杂的。这两种反应都需要维生素 C 或抗坏血酸(第十三章)才能使体内过程达到最活跃的程度。食物内缺乏这种维生素时在豚鼠将引起苯丙酮酸和尿黑酸在尿中排泄。有先天性尿黑酸 1, 2-二氧酶缺陷的人,尿中含尿黑酸。当这种尿被碱化或暴露于氧时就变为黑色,因为

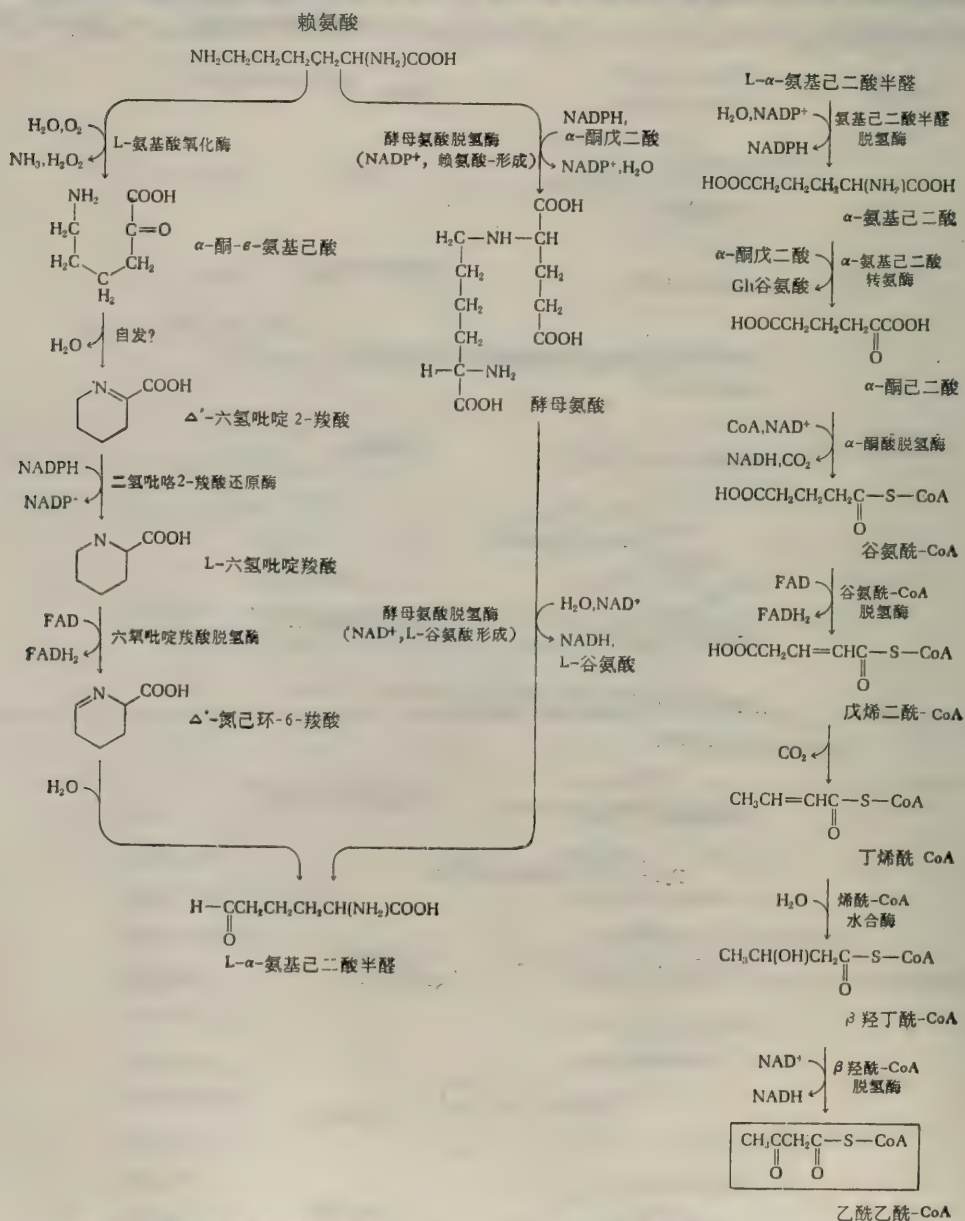


图 21-14 赖氨酸转变为乙酰乙酰 CoA。如图所示,自赖氨酸到  $\alpha$ -氨基己二酸半醛有两条途径。在肝内以经中间产物酵母氨酸的途径为主。



尿黑酸经过氧化和聚合形成了黑色的色素(即黑色素)。这种情况叫尿黑酸尿症。患此病的病人结缔组织有不正常的色素沉着。

图 21-13 表示亮氨酸的四个碳原子转变成乙酰乙酰 CoA 的途径,亮氨酸因而是生酮氨基酸。亮氨酸的其他两个碳原子转变为乙酰 CoA。在亮氨酸的  $\alpha$ -氨基转氨作用和相应的  $\alpha$ -酮酸氧化脱羧作用后,生成异戊酰 CoA。异戊酰 CoA 脱氢后,加羧基,经过水合作用,生成 6-碳  $\beta$ -羟- $\beta$ -甲基戊二酰 CoA。后者又裂解产生一分子乙酰 CoA 和一分子乙酰乙酸。乙酰乙酸又与琥珀酰 CoA 起反应转变为乙酰乙酰 CoA。亮氨酸降解过程中生成的中间产物  $\beta$ -羟- $\beta$ -甲基戊二酰 CoA 也是胆固醇生物合成中的重要前身物。

图 21-14 所示途径相当复杂。通过这一途径另一个生酮氨基酸——赖氨酸的六个碳原子中的 4 个转变为乙酰乙酰 CoA。另两个碳原子在脱羧反应中丢失。赖氨酸不进行转氨作用。在一种途径中赖氨酸首先与  $\alpha$ -酮戊二酸缩合生成酵母氨酸。酵母氨酸最终又转化为乙酰乙酰 CoA。在另一种途径中,赖氨酸的  $\alpha$ -氨基被氧化。大概是  $\alpha$ -氨基酸氧化酶的作用,两个途径在  $\alpha$ -氨基己二酸半醛的形成处汇合。

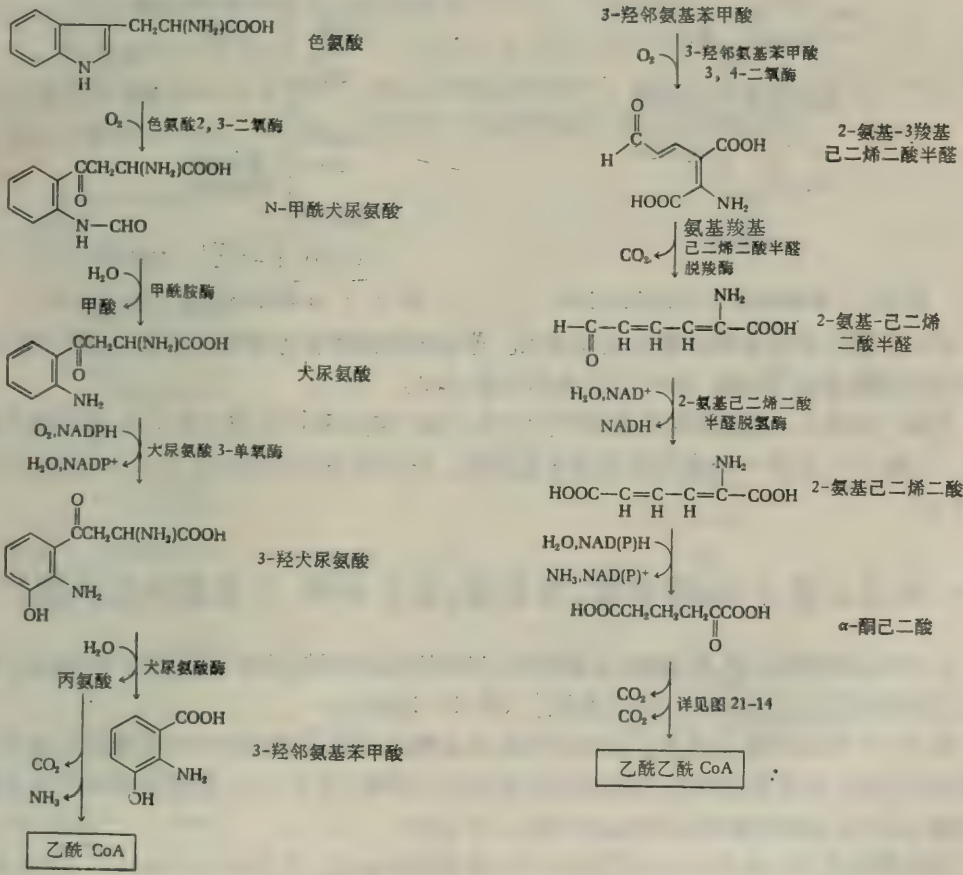


图 21-15 色氨酸转变为乙酰 CoA 和乙酰乙酰 CoA。

图 21-15 表示色氨酸的 11 个碳原子中 4 个碳原子转变为乙酰乙酰 CoA, 2 个碳原子转变为乙酰 CoA 的途径的主要步骤;其余的转变成为 4 个  $\text{CO}_2$  分子和一个甲酸。第一个步骤由色氨酸 2, 3-二氧酶, 亦称色氨酸吡咯酶所催化。这个酶含铜和血红素基团, 能利用

分子氧使色氨酸氧化为 N-甲酰-L-犬尿氨酸。人体内这种酶有时会有遗传学上的缺陷，造成智力发育迟缓。后一个中间产物，3-羟犬尿氨酸被某些昆虫用作为一种色素（称为眼色素）的前身物，犬尿氨酸酶催化 3-羟犬尿氨酸裂解，生成丙氨酸和 3-羟邻氨基苯甲酸。此酶含有磷酸吡哆醛。哺乳动物缺乏维生素 B<sub>6</sub> 时，大量的 L-犬尿氨酸自尿中排泄。中间产物 3-羟邻氨基苯甲酸亦可作为维生素菸酸生物合成的前身物。色氨酸分解代谢的中间产物是其他重要物质包括血清紧张素（5-羟色胺）——一种神经递素和血管收缩剂，以及植物激素吲哚乙酸生物合成的前身物。（图 21-16）

### 直接到达乙酰 CoA 的途径(苏氨酸、亮氨酸、色氨酸和异亮氨酸)

苏氨酸(四个碳原子)有两种可能的途径。在第一个途径中，苏氨酸通过丝氨酸羟甲基转移酶(能使丝氨酸或苏氨酸醛醇裂解)(图 21-17)的作用裂解为两个二碳化合物：乙醛和甘氨酸。从苏氨酸生成的乙醛转化为乙酰 CoA；甘氨酸的降解过程已讨论如上。

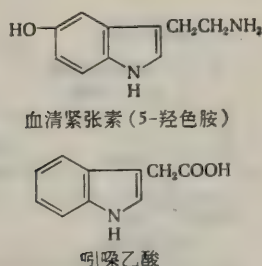


图 21-16 色氨酸的两个生物活性衍生物

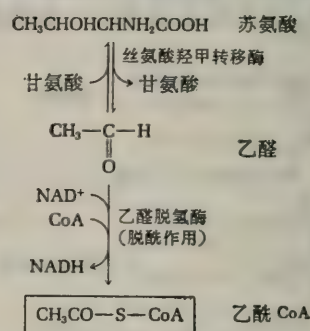


图 21-17 由苏氨酸到乙酰 CoA 的途径

第二个途径是苏氨酸降解的次要途径。苏氨酸脱氢酶将苏氨酸转变为  $\alpha$ -酮丁酸，后者经氧化脱羧变成琥珀酰 CoA 的前身物丙酰 CoA。

上面已经提出，亮氨酸和色氨酸碎片在其分解代谢过程中生成乙酰 CoA 和乙酰乙酰 CoA。乙酰 CoA 的另一个直接来源是异亮氨酸。它碎裂后产生琥珀酰 CoA 和乙酰 CoA。（见下文）

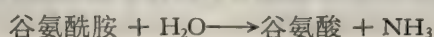
### $\alpha$ -酮戊二酸途径(精氨酸、组氨酸、谷氨酰胺、谷氨酸和脯氨酸)

五种氨基酸(精氨酸、组氨酸、谷氨酰胺、谷氨酸和脯氨酸)的碳骨架通过  $\alpha$ -酮戊二酸进入三羧酸循环。它们都是生糖氨基酸。（图 21-18）

图 21-19 所示的精氨酸途径发生在哺乳类动物的肝脏。精氨酸在精氨酸酶的作用下转变成鸟氨酸，经尿素循环合成尿素时也使用这一步骤（见下文）。鸟氨酸再转化为谷氨半醛，后者也是脯氨酸氧化的中间产物。（见下文）

组氨酸氧化成谷氨酸的途径(图 21-20)是值得注意的，因为咪唑环被打开，产生 N-亚胺甲基谷氨酸。其中亚胺甲基 (HN=CH-) 的脱除依靠一种酶，这酶以四氢叶酸作为 1-碳基团受体。

谷氨酰胺由谷氨酰胺酶水解成为谷氨酸，特别是在肾脏中：





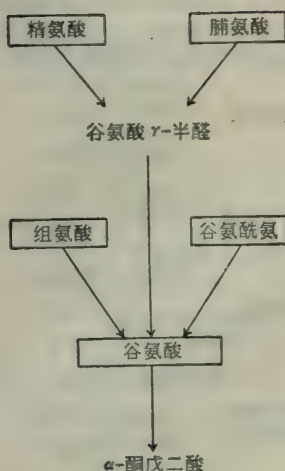


图 21-18 到 α-酮戊二酸的途径

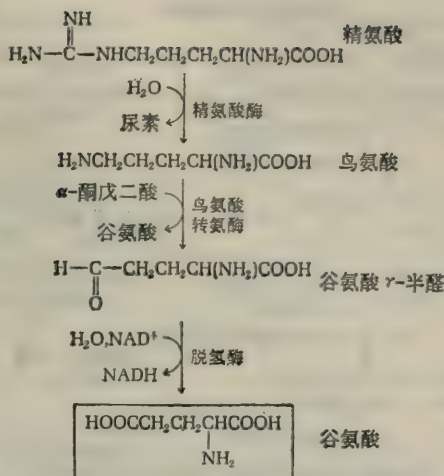


图 21-19 哺乳动物将精氨酸转变为谷氨酸的主要途径

谷氨酰胺也通过谷氨酸合成酶转变成谷氨酸:



第三条途径是谷氨酰胺与 α-酮戊二酸进行转氨作用产生 α-酮戊酰胺酸(图 21-21)。后者或者又水解成 α-酮戊二酸和氨,或者环化生成内酯(2-羟-5-羟脯氨酸)。

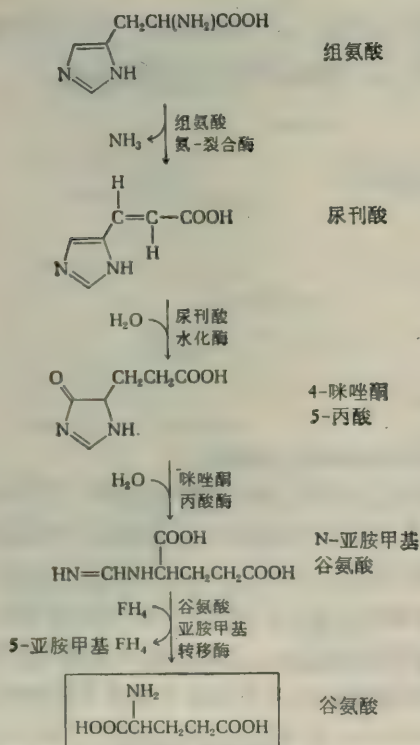


图 21-20 哺乳动物将组氨酸转变为谷氨酸的主要途径。FH<sub>4</sub> 代表四氢叶酸,它是亚胺甲基的受体。

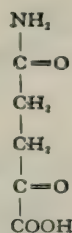


图 21-21 α-酮戊酰胺酸

L-脯氨酸在脱氢后,环开放生成 L-谷氨酸半醛,然后再还原成 L-谷氨酸(图 21-22)。4-羟脯氨酸是胶原蛋白的一种成分。它以另一种途径经由 γ-羟谷氨酸变成丙氨酸和甘

羟脯氨酸的分解代谢,从羟脯氨酸到  $\gamma$ -羟谷氨酸的反应类似于左侧脯氨酸分解代谢。 $\gamma$ -羟谷氨酸后续的代谢过程稍微不同,生成丙氨酸和甘氨酸。

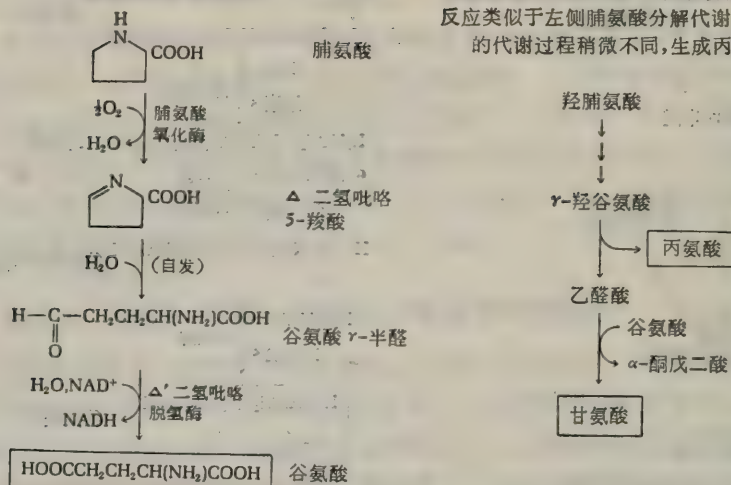


图 21-22 脯氨酸与羟脯氨酸的分解代谢

氨酸,后两者再按上面所述的途径降解。

## 琥珀酸途径(甲硫氨酸、异亮氨酸和缬氨酸)

甲硫氨酸、异亮氨酸和缬氨酸的碳骨架最终都经由丙酰 CoA 和甲基丙二酰 CoA 降解为琥珀酰 CoA, 后者脱酰生成琥珀酸(图 21-23); 因此这些氨基酸都是生糖氨基酸。

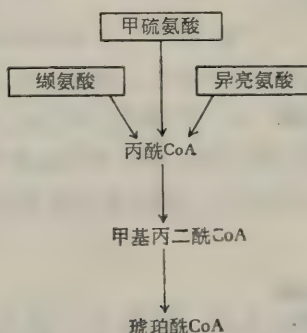


图 21-23 甲硫氨酸、异亮氨酸和缬氨酸转变为琥珀酸 CoA 的途径。

甲硫氨酸(图 21-24)在三个重要反应的序列中失去甲基生成同型半胱氨酸,其中包括中间产物 S-腺苷甲硫氨酸。这将在第二十五章论述。同型半胱氨酸与丝氨酸结合生成胱硫醚,它再裂解成半胱氨酸、氨和  $\alpha$ -酮丁酸,后者氧化脱羧成为丙酰 CoA。丙酰 CoA 羧化生成 D-甲基丙二酰 CoA,通过甲基丙二酰 CoA 消旋酶的作用 D-甲基丙二酰 CoA 变成 L-甲基丙二酰 CoA。所产生的 L 型继而重新排列变成琥珀酰 CoA,在此过程中涉及一个需辅酶 B<sub>12</sub> 的甲基丙二酰 CoA 变位酶。通过上述途径甲硫氨酸的三个碳原子便变为琥珀酸。

异亮氨酸和缬氨酸的降解形式甚为相似(图21—25),两者都进行转氨作用,所产生的 $\alpha$ -酮酸继续氧化脱羧。后者的支链又以平行的方式降解。缬氨酸和异亮氨酸均产生丙酰 CoA。如上所述,丙酰 CoA 羧化后所形成的甲基丙二酰 CoA 转变为琥珀酰 CoA。这样,异亮氨酸和缬氨酸的三个碳原子就变为琥珀酸。



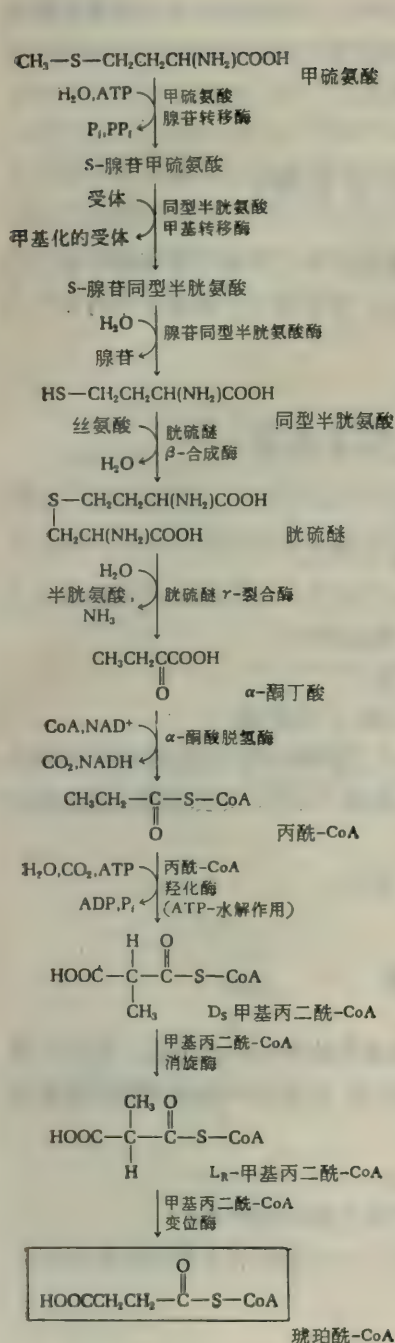


图 21-24 甲硫氨酸转变为琥珀酰 CoA

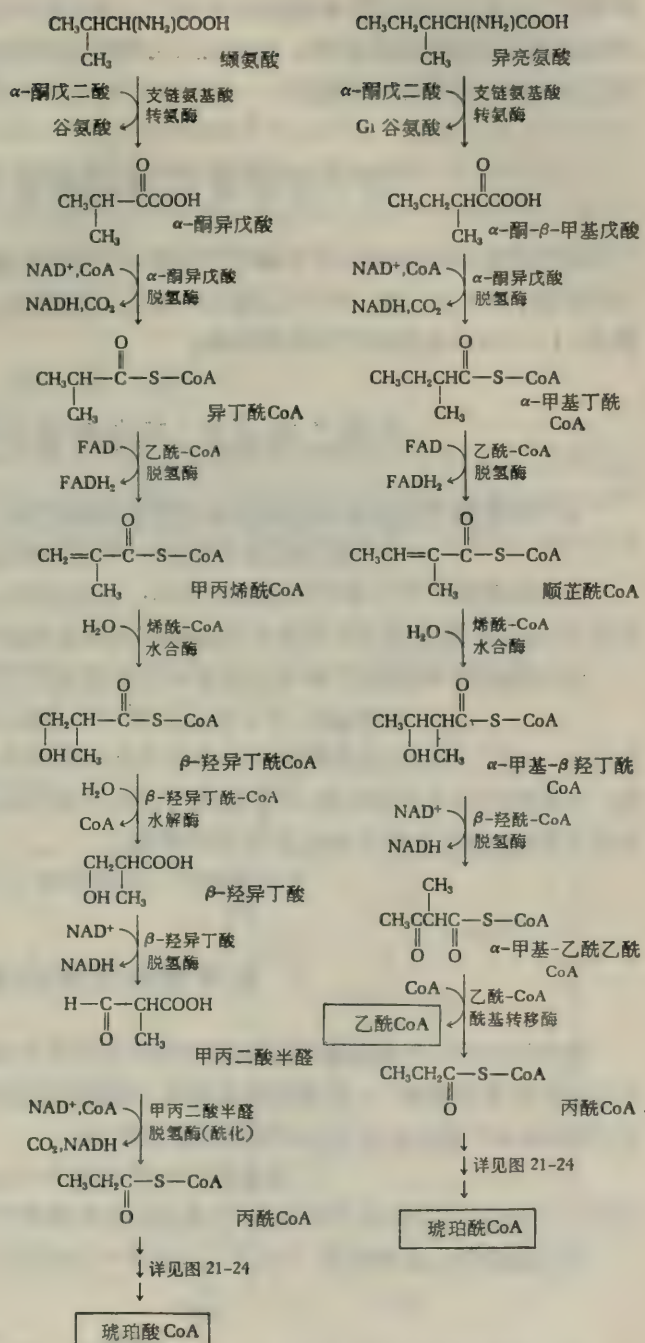


图 21-25 缬氨酸转变为琥珀酰 CoA 以及异亮氨酸转变为琥珀酰 CoA 和乙酰 CoA。注意这两条途径与亮氨酸分解代谢途径(图 21-13)之间的相似处。

值得注意的是  $\alpha$ -酮异戊酸,  $\alpha$ -酮  $\beta$ -甲戊酸以及  $\alpha$ -酮异己酸 (缬氨酸、异亮氨酸和亮氨酸的脱氨基的相应产物) 是受同一种酶 ( $\alpha$ -酮异戊酸脱氢酶) 催化的。有些人的这种酶有遗传性缺陷, 致使尿中有这些  $\alpha$ -酮酸排出。这一罕见的情况引起严重的智力发育迟缓,

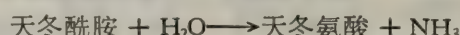
称为碱糖尿病,因为这些  $\alpha$ -酮酸使尿具有一种特殊的气味。十分值得注意的是数种涉及到氨基酸代谢的遗传性缺陷,均可在人类导致智力发育迟缓。其中有些病例可能是由于某些神经束不能髓鞘化引起的。

### 延胡索酸途径(苯丙氨酸和酪氨酸)

苯丙氨酸和酪氨酸的 9 个碳原子中有 4 个经这一途径。如上所述,这些氨基酸中的 6 个碳原子经乙酰乙酰 CoA 和乙酰 CoA 进入三羧酸循环。余下的 5 个碳原子中有 4 个经图 21-11 所示的途径转变为延胡索酸。

### 草酰乙酸途径(天冬酰胺和天冬氨酸)

天冬酰胺首先由天冬酰胺酶水解为天冬氨酸和氨:

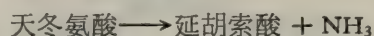


天冬酰胺酶广泛分布于动植物组织中,在某些病人注射天冬酰胺酶入血对控制白血病有效;大概此酶是通过限制恶性白细胞利用天冬酰胺起作用的。

天冬氨酸和  $\alpha$ -酮戊二酸进行转氨作用生成草酰乙酸:

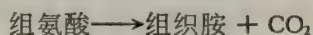


通过这一途径,这两种氨基酸的四个碳原子全部都可进入三羧酸循环;它们都是生糖氨基酸。在植物以及某些微生物,天冬氨酸可由天冬氨酸解氨酶(又称天冬氨酸酶,动物组织缺乏这种酶)催化直接去  $\text{NH}_3$  生成延胡索酸:

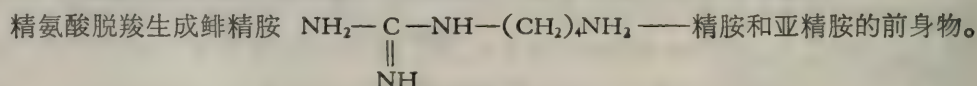


### 氨基酸的脱羧作用

动物组织的几种氨基酸可以脱羧产生相应的具有特殊生物学作用的伯胺。例如组氨酸可由组氨酸脱羧酶(一种磷酸吡哆醛酶)脱羧生成组织胺,后者是一种强大的舒血管物质,可因变态反应性过敏或炎症由某些组织释出:

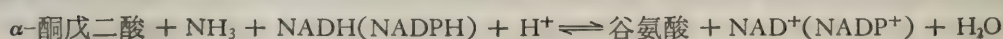


同样的,色氨酸可以脱羧生成色胺,它是植物生长激素吲哚乙酸的前身物。



### 含氮排泄物的形成

大多数高等生物通过谷氨酸脱氢酶反应的逆过程,重新利用氨基酸分解代谢所得的氨:



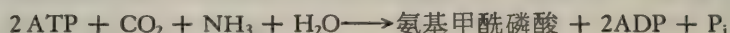




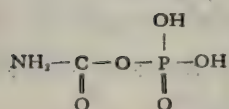
P. P. Cohen 实验室的研究,详细地确定了尿素合成的酶促步骤。在这一序列中(图 21-26)有两个最初由  $\alpha$ -氨基酸衍生而来的氨基和一分子二氧化碳进入,并经一需要 ATP 参与的循环过程产生一分子尿素——一种中性的无毒的化合物,然后经血液运到肾脏随尿排出体外。

进入尿素循环的第一个氨基来源于肝线粒体内谷氨酸氧化脱氨产生的游离氨:

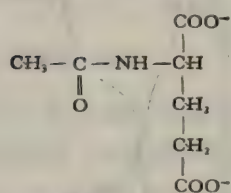
谷氨酸 +  $\text{NAD}^+(\text{NADP}^+) + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \alpha\text{-酮戊二酸} + \text{NH}_3 + \text{NADH}(\text{NADPH}) + \text{H}^+$   
然后利用所产生的游离氨和二氧化碳一起,在一个由线粒体基质内的氨基甲酰磷酸合成酶(氨)所催化的复杂反应中,生成极不稳定的化合物——氨基甲酰磷酸(图 21-27):



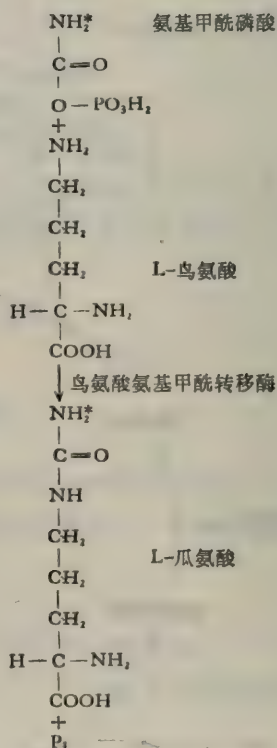
在此反应中每生成一个分子的氨基甲酰磷酸,需要两分子 ATP,反应基本上是不可逆的。这一复杂反应至少有两个步骤,需要 N-乙酰谷氨酸(图 21-27)作为激活性变构活化剂。通过这一途径在线粒体内产生氨基甲酰磷酸是尿素合成所特有的。但有些组织以及在细菌和霉菌的胞汁中则可由另一种酶——氨基甲酰磷酸合成酶(谷氨酰胺)催化的另一种反应产生。



氨基甲酰磷酸



N-乙酰谷氨酸

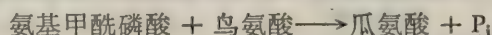


L-瓜氨酸

图 21-27 氨基甲酰磷酸合成酶(氨)反应中各成分的结构

图 21-28 鸟氨酸转变为瓜氨酸。由氨基甲酰磷酸引进的氨基用\*表示。

在线粒体中产生的氨基甲酰磷酸现将其氨基甲酰基交给鸟氨酸,后者在胞汁中形成,通过一特异的内膜运输系统进入线粒体中。其产物是瓜氨酸:



此反应(图 21-28)由线粒体基质的鸟氨酸氨基甲酰转移酶催化。所生成的瓜氨酸现在离



开线粒体基质进入胞汁,尿素循环的其余反应就在胞汁内进行。

尿素合成所需要的第二个氨基以天冬氨酸的形式进入。天冬氨酸是在胞汁中通过天冬氨酸转氨酶的作用从谷氨酸获得此氨基的。天冬氨酸的氨基在 ATP 的参与下与瓜氨酸的氨基甲酰碳原子可逆地缩合为精氨琥珀酸(图 21-29);此反应受精氨琥珀酸合成酶催化:

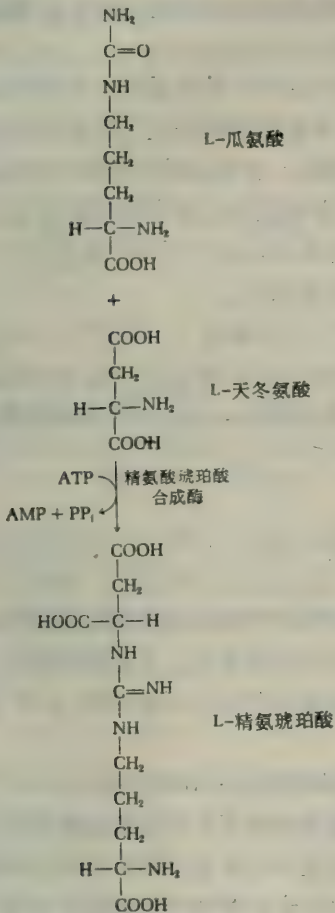


图 21-29 精氨琥珀酸的形成

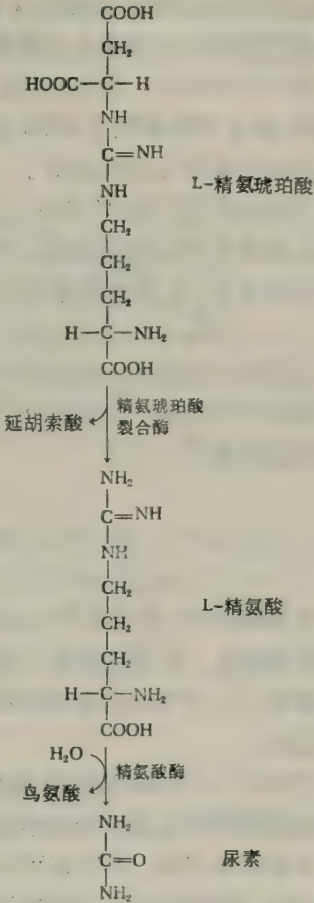
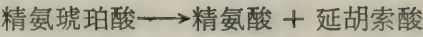


图 21-30 精氨酸的形成和水解

反应生成的焦磷酸被焦磷酸酶水解为无机磷酸,因而推动整个反应向右移。精氨琥珀酸在下一反应中受精氨琥珀酸裂合酶的作用(图 21-30)进行 β 消去反应生成游离的精氨酸和延胡索酸:



此反应生成的精氨酸成为尿素的直接前生物,而延胡索酸则回到三羧酸循环的中间产物池中去。凡是能生物合成精氨酸的所有生物都能使用上述反应。但只有排尿素的动物才具有大量的精氨酸酶,可以将精氨酸裂解为尿素和重新产生鸟氨酸。这一反应在胞汁内进行:



精氨酸的分子量为 120,000，含四个亚基，每一亚基与一个  $Mn^{2+}$  离子紧密地结合。

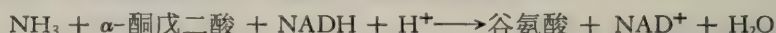
尿素循环的总方程式是：



因此，每生成一分子尿素需要水解四个由 ATP 供应的高能磷酸根。

在人类尿素循环中每一种不同的酶都曾发现有遗传缺陷。此种病人不能耐受蛋白质的摄食；他们表现有智力缺陷，神经系统发育迟缓，以及血中游离氨过量。其中有些病人可以用类似必需氨基酸的  $\alpha$ -酮酸混合物代替食物蛋白质进行治疗。 $\alpha$ -酮酸可去除血液中氨转变为组织蛋白合成所需要的  $\alpha$ -氨基酸。

如上所提出的，催化氨基进入尿素循环的某些酶类，特别是天冬氨酸转氨酶、谷氨酸脱氢酶、氨基甲酰磷酸合成酶(氨)和鸟氨酸氨基甲酰转移酶均位于肝细胞的线粒体内，因而在胞汁和线粒体之间提供了一个相当复杂的隔室，将氨基酸的分解代谢和尿素合成两类反应分隔开来(图 21-26)。这一分隔对阻止游离氨在血液中聚积看来是必要的，游离氨对排尿素脊椎动物有剧毒，特别是对中枢神经系统。氨之所以有毒是因为在谷氨酸脱氢酶的催化下，它使线粒体内的  $\alpha$ -酮戊二酸还原氨基化：



由于这一反应的平衡过于向右，氨能有效地移去三羧酸循环中的  $\alpha$ -酮戊二酸，引起脑内呼吸严重抑制，并使肝内乙酰 CoA 形成过多的酮体。因此，肝内游离氨的浓度受到十分细致的调节。

## 氨 的 排 泄

在排氨动物，来自各种  $\alpha$ -氨基酸的氨基经转氨作用形成谷氨酸，然后由谷氨酸脱氢酶氧化脱氨基。所形成的氨于是转变为谷氨酰胺中的酰胺基。谷氨酰胺是这类有机体氨的运输形式。它是由谷氨酸和氨，在谷氨酰胺合成酶的催化以及消耗 ATP 能量的情况下形成的：



谷氨酰胺合成酶在氨基酸的中间代谢中起极其重要的作用，因为谷氨酰胺不单是氨的一种无毒的运输方式，而且还可用作许多生物合成反应的氨基供体。动物组织的和细菌的谷氨酰胺合成酶之间存在明显的差别，这将在第二十五章进一步叙述：谷氨酰胺的酶促形成显然经过中间产物  $\gamma$ -谷氨酰磷酸(图 21-31)，后者与氨反应之前与酶结合在一起。谷氨酰胺是大多数脊椎动物肾小管形成游离氨的来源，但在排氨动物此反应特别突出，是一种由谷氨酰胺酶催化的水解反应：

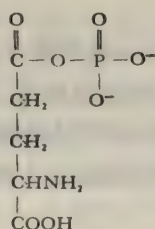
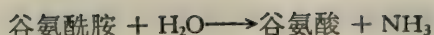


图 21-31  $\gamma$ -谷氨酰磷酸

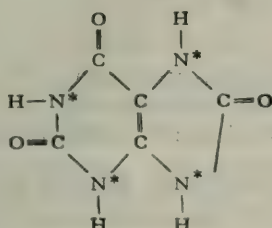




生成的氨直接进入尿中。

## 尿酸的形成

排尿酸机体(陆栖爬行类和鸟类)主要以尿酸的形式排泄  $\alpha$ -氨基酸的氨基。尿酸正好也是灵长类、鸟类和陆栖爬行类嘌呤代谢的终产物。由氨形成尿酸的途径是很复杂的,因为须首先由较小的前身体形成嘌呤环;这将在第二十六章详细讨论。尿酸的结构见图 21-32。



尿酸(酮式)

图 21-32 鸟和爬行类以尿酸方式排泄氨基氮。尿酸的氮原子(用\*表示)来源于氨基酸的  $\alpha$ -氨基。嘌呤和尿酸形成的途径见别处。

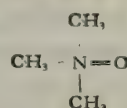


图 21-33 氧化三甲铵

在不同种族的动物,尿素、氨和尿酸并不是排泄氨基酸分解代谢产生的氮的仅有的形式。蜘蛛以鸟嘌呤代替尿酸排泄氨基氮,许多鱼类以氧化三甲铵排泄氮(图 21-33)。在高等植物中谷氨酰胺和天冬酰胺的作用是运输和储存氨基。

## 摘 要

在脊椎动物的消化道中,胃蛋白酶、胰蛋白酶、糜蛋白酶、羧基肽酶和亮氨酸氨基肽酶等水解酶将摄入的蛋白质完全水解产生游离的氨基酸,它们吸收入血,运到肝脏,大部分氨基酸在此进行分解代谢。

氨基酸的碳骨架经氧化降解为能进入三羧酸循环氧化的化合物。大多数  $\alpha$ -氨基酸的氨基经转氨作用转给  $\alpha$ -酮戊二酸生成谷氨酸,谷氨酸则受谷氨酸脱氢酶作用氧化脱氨基。D-氨基酸由 D-氨基酸氧化酶脱氨基。L-氨基酸的碳原子进入三羧酸循环可经过五种途径:(1) 乙酰 CoA; (2)  $\alpha$ -酮戊二酸; (3) 琥珀酸; (4) 延胡索酸; (5) 草酰乙酸。经乙酰 CoA 进入三羧酸循环的氨基酸分为两类。第一类包括丙氨酸、苏氨酸、甘氨酸、丝氨酸和半胱氨酸,它们在转变为乙酰 CoA 的途中产生丙酮酸(因此属生糖氨基酸)。第二类(苯丙氨酸、酪氨酸、亮氨酸、赖氨酸和色氨酸)在转变为乙酰 CoA 的途中产生乙酰乙酰 CoA。精氨酸、组氨酸、谷氨酰胺、谷氨酸和脯氨酸经  $\alpha$ -酮戊二酸进入;甲硫氨酸、异亮氨酸和缬氨酸经琥珀酸进入;苯丙氨酸和酪氨酸的四个碳原子经延胡索酸进入;而天冬酰胺和天冬氨酸经草酰乙酸进入。在人,氨基酸分解代谢的酶类中可以出现一些遗传性缺陷。其中有许多引起严重的病理障碍。氨基酸分解代谢的途径是复杂的,有许多中间产物常

用作细胞的其它重要成分的前身物。

在排尿素动物(陆栖的哺乳动物和成年的两栖类),由尿素循环形成的尿素是氨基氮的最终排泄产物。尿素由精氨酸酶作用于精氨酸产生,另一裂解产物为鸟氨酸。鸟氨酸靠消耗氨基甲酰磷酸而氨基甲酰化为瓜氨酸,继而再消耗天冬氨酸将亚氨基加入瓜氨酸上重新合成精氨酸。尿素循环在肝内进行。排氨动物(大多数鱼类)以氨的形式排泄氨基氮,氨由谷氨酰胺水解而来。谷氨酰胺则是在谷氨酰胺合成酶作用下由谷氨酸和氨(来自 $\alpha$ -氨基)生成。排尿酸动物(鸟和陆栖爬行类)以尿酸(一种嘌呤衍生物)形式排泄氨基氮。

## 参 考 文 献

### 书籍

- Dagley, S., and D. E. Nicholson: *Metabolic Pathways*, Wiley, New York, 1970.  
Greenberg, D. M. (ed.): *Metabolic Pathways*, vol. 3, Academic, New York, 1969.  
Meister, A.: *Biochemistry of the Amino Acids*, 2d ed., vols. 1 and 2. Academic, New York, 1965. Comprehensive and detailed treatise.  
Stanbury, J. O., J. B. Wyngaarden, and D. S. Fredrickson (eds.): *The Metabolic Basis of Inherited Disease*, 3d ed., McGraw-Hill, New York, 1972. Excellent comprehensive text on human genetic defects affecting metabolism.  
Tabor, H., and C. W. Tabor (eds.): *Metabolism of Amino Acids and Amines*, vol. 17, pts. A and B of *Methods in Enzymology*, Academic, New York, 1970—1971.

### 论文

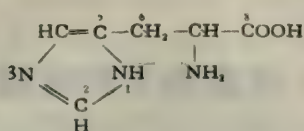
- Adams, E.: "The Metabolism of Hydroxyproline," *Mol. Cell. Biochem.*, 2: 109 (1973).  
Braunstein, A. E.: "Amino Group Transfer," pp. 379—482 in P. D. Boyer (ed.), *The Enzymes*, 3d ed., vol. 9, pt. B, Academic, New York, 1973. Definitive review of transamination reactions.  
Cohen, P. P., and G. W. Brown, Jr.: "Ammonia Metabolism and Urea Biosynthesis," pp. 161—294 in M. Florkin and H. S. Mason (eds.), *Comparative Biochemistry*, vol. 11, Academic, New York, 1961. Comparative and developmental aspects of urea excretion.  
Cunningham, L.: "The Structure and Mechanism of Action of Proteolytic Enzymes," pp. 85—188 in M. Florkin and E. H. Stoltz (eds.), *Comprehensive Biochemistry*, vol. 16, Academic, New York, 1965. Review of proteolytic reactions.  
Eisenberg, H.: "Glutamate Dehydrogenase: Anatomy of a Regulatory Enzyme," *Acc. Chem. Res.*, 4: 379—385 (1971).  
Kikuchi, G.: "The Glycine Cleavage System: Composition, Reaction Mechanism, and Biological Significance," *Mol. Cell. Biochem.*, 1: 169—187 (1973).  
Koberstein, R., and H. Sund: "Studies of Glutamate Dehydrogenase," *Eur. J. Biochem.*, 36: 545—552 (1973).  
Ratner, S.: "Enzymes of Arginine and Urea Synthesis," *Adv. Enzymol.*, 39: 1 (1973).

## 习 题

1. 某一人类遗传性疾病,其血浆异戊酸水平异常升高。
  - (a) 可能涉及哪一种氨基酸的代谢?
  - (b) 假如这一氨基酸及其 $\alpha$ -酮类似物的血液含量正常,试预测可能是哪种酶有缺陷。
2. 丙氨酸-丙酮酸 +  $\text{NH}_4^+$  底物偶联的  $E_0'$  值为  $-0.13$  伏。计算丙氨酸氧化为丙酮酸的标准自由能  $\Delta G^0$  的变化,假定氧化剂是 (a) 吡啶核苷酸, (b) 黄素蛋白 ( $E_0' = 0.00$  伏)。
3. 写出 (a) 排氨动物, (b) 排尿素动物体内发生的苯丙氨酸完全氧化的平衡方程式。包括此过程的全部活化过程和能量储存步骤。
4. 计算 (a) 缬氨酸氧化为  $\text{CO}_2$ 、 $\text{H}_2\text{O}$  和  $\text{NH}_3$ , (b) 苏氨酸氧化为  $\text{CO}_2$ 、 $\text{H}_2\text{O}$  和尿素所产生的 ATP 分子数。

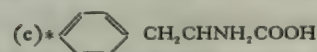


5. 组氨酸分解代谢中, 下图有标号的原子将出现在谷氨酸的哪些位置上?



6. 写出丙氨酸转变为乙酰乙酸和尿素的总平衡方程式。

7. 下图带标记的化合物在动物组织中氧化后, 将在  $\alpha$ -酮戊二酸的哪些碳原子上出现标记?



8. 一个 70 公斤的人, 进一定量的食物, 每日产能 3,000 千卡, 每日排出的尿素为 27.0 克。假定 1 克蛋白质产生 4.0 千卡和 0.16 克尿素氮。试问每日由蛋白质提供的能量占所需能量的百分之几?

9. 比较人肝内葡萄糖、丁酸和丙氨酸完全燃烧时, 每一碳原子净得的能量——以产生的 ATP 表示。

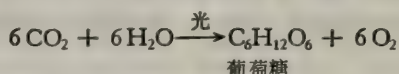
10. 根据原书 (493 页至 496 页) 描述的典型转氨基反应以及双底物反应动力学小结 (图 8-13), 预测丙氨酸氨基转移酶动力学实验可能出现何种类型的反应: 如果 (a) 当氨基酸底物浓度改变而酮酸底物固定于高浓度时, 以  $1/v_0$  对  $1/[\text{磷酸吡哆醛}]$  作图。(b) 当酮酸底物浓度改变而磷酸吡哆醛固定于高浓度时, 以  $1/v_0$  对  $1/[\text{氨基酸底物}]$  作图。

[黄美霞译 唐恢玲校]

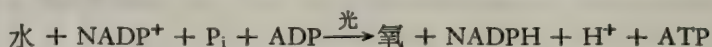
## 第二十二章 光合电子的传递和磷酸化作用

目前我们对光合作用的定义,是指植物细胞利用太阳的光能进行细胞成分的生物合成。它是一个对所有活机体都是基本的新陈代谢过程。通过生物界食物链的运转,太阳能不仅是绿色植物和其他光合自养生物的直接能源,而且也是几乎所有异养生物的根本能源。此外,人类在产生热能、光能和动力等方面所利用的全部能量,将有 90% 以上来源于光合作用所捕获的太阳能。这是因为大多数人造机器所用的燃料,如煤、石油和天然气等,都是几百万年以前由光合型生物生成的生物物质的分解产物。

如把光合作用的发生看作两个主要阶段是方便和有利的。这两阶段的生化本质,可以用高等植物的光合作用情况加以最简单的说明。通常用方程式表示为:



今天我们已知,这个全过程可分为两阶段:第一阶段是通过吸光色素捕获光能,并将它转变为 ATP 的化学能和某些还原剂,特别是 NADPH。在此过程中,氢原子从水分子脱下使  $\text{NADP}^+$  还原,放出植物光合作用的副产物——分子氧;同时 ADP 被磷酸化,生成了 ATP。现将光合作用第一阶段的总方程式,在这一点上用未经平衡的形式表示如下:



在光合作用的第二阶段,第一阶段的高能产物 NADPH 和 ATP 可用作能源,以使  $\text{CO}_2$  还原成葡萄糖;同时, NADPH 再被氧化成  $\text{NADP}^+$ ,而 ATP 再次分解为 ADP 和磷酸。光合作用的第二阶段可用通式表示:



此反应是经由通常不需要光的酶促反应而实现。确实,在光合作用的第二阶段中,在动物组织内也已经发现了许多催化  $\text{CO}_2$  转变成葡萄糖的酶类。

光合作用第一阶段的一系列反应,包括光能转化为 NADPH 和 ATP 的化学能的反应,可以不精确地称为光合作用的光反应或光相。在第二阶段,植物将  $\text{CO}_2$  形成了葡萄糖和其他还原产物,可称为暗反应或暗相。虽然除了见于高等绿色植物的那些反应以外,还有其它类型的光合作用,但在所有这些情况下,我们都能识别有光相和暗相。

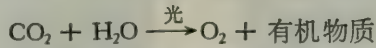
在本章,我们把注意力放在重点讨论光合作用的光反应,而有关暗反应则将在下一章讨论糖的生物合成中叙述。

### 几个历史性标志

Joseph Priestley 是氧气发现者之一。在 1770—1777 年这段时期内,他曾作过关于光合作用时物质交换的某些最早的重要实验。他确证,一个密闭容积的空气可以被一枝点燃的蜡烛“耗尽”,这样就不能维持一只小鼠所需要的氧气。如在容器里放入一小枝薄荷,经



过几周后氧气又可“恢复”,并再能维持一只小鼠的呼吸或一支蜡烛的燃烧。他的结论是,绿色植物能放出氧,这似乎是能引起耗氧的动物呼吸的逆过程。奇怪的是, Priestley 没有注意到绿色植物的这一作用需要光。只是在几年后,有一位荷兰医生 Ingenhousz 才认识这一事实,他也首先确定仅仅是植物的绿色部分在光照下才能生成氧。后来,在十九世纪初期,对  $\text{CO}_2$  的同化、放氧和生成的植物物质进行了定量的平衡研究。直到十九世纪中叶,从这些研究和 Robert Mayer 关于阳光可提供能量以生成光合产物的发现,才一起得出了下列总方程式:



另一个标志是 1880 年 Engelmann 发现叶绿体与放氧有关。他在显微镜下观察到,当把小的需氧的能动细菌加到一种真核螺旋藻类的悬浮液中时,这些细菌便向位于藻细胞的单个大螺旋形叶绿体附近的细胞表面部分移动,但这只有在细胞受光照后出现。由于这些细菌寻求富于氧的地区,Engelmann 曾作出这样的结论,认为叶绿体是产生氧的部位。

## 生物中光合作用的发生

进行光合作用的能力,广泛地存在于原核和真核生物这两个领域的生物界。光合型真核生物不仅包括我们熟悉的高等绿色植物,也包括单细胞的和多细胞的绿藻、褐藻和红藻,以及眼虫类、横裂甲藻类和硅藻类等。

光合型原核生物,对我们来说是不太熟悉的,需要作些说明。这是因为它们在生物界起有重要作用,并大量用于光合作用的研究。它们是一类极古老的生物,是最早的光合型细胞的后代。它们包括蓝藻、绿硫细菌和紫细菌。蓝藻以单细胞或菌落的形式生存,它们在土壤、淡水和海洋中非常丰富。它们生存时能以二氧化碳作为碳的唯一来源;某些蓝藻也能固定大气氮。绿硫细菌是严格的厌氧菌,它们生活在富于含硫有机物的池塘和湖泊中。一些山上湖泊的绿色是由于绿硫细菌(绿硫菌属)所造成的。紫硫细菌,例如红硫细菌(*Chromatium*),是严格的厌氧菌,它们需要硫化氢、硫或硫代硫酸盐;在池塘和含硫的矿泉中可以找到它们。非硫紫细菌,例如深红红螺菌(*Rhodospirillum rubrum*),则需要有乙醇、乙酸、 $\beta$ -羟丁酸或异丙醇等有机分子。

认为光合作用大多发生在高等植物中,这是一种常有的误解。实际上,地球表面有半数以上的光合作用是由那些用显微镜才能见到的藻类、硅藻类和横裂甲藻类在海洋中进行的,它们一起构成浮游植物。

## 光合系统的细胞内结构

在真核细胞中,其光合装置集中于叶绿体内。这是几种不同质体中的一种,是一些由膜围绕起来的为植物细胞所特有的细胞器。叶绿体是可以自我复制的细胞器;它们和线粒体一样含有 DNA。一种高等植物光合型细胞的电子显微镜照片,示于第一章图 1-9。叶绿体一般比线粒体大得多,但它们的大小范围很宽,其直径从 1 到 10 微米。它们的形状通常呈球形或盘状,但有时形态异常,例如水绵(*Spirogyra*)的叶绿体呈带状样的螺旋

形结构。在某些真核藻类,其每个细胞只有一个叶绿体,而一个高等植物细胞所含的叶绿体可能多达 40 个。

叶绿体很容易从某些绿色植物组织中分离出来,菠菜叶是其最普通的来源。将菠菜叶放入盛有 0.35 M NaCl 或 0.3—0.4 M 蔗糖介质(缓冲到 pH 8.0)的捣碎器中,慢慢搅成匀浆。这种叶子的悬浮液经细布过滤,并轻轻地离心以除去细胞渣。再在 1,000 g 离心几分钟,使叶绿体沉降。将叶绿体重新悬浮于 0.35 M NaCl 液中离心,进行一次或多次洗涤。当细心分离时,得到的叶绿体比较完整,且保留了涉及光诱发  $\text{CO}_2$  还原成己糖的全部反应的能力。

叶绿体被一个单层连续的外膜所环绕,这个膜相当脆(图 22-1)。其内膜系统是连续的,但排列成成对的折叠,叫做片层。内膜系统围住一个含有基质的隔室,类似于线粒体的间质。片层以规则的间隔扩大,形成扁平的膜囊或泡囊,称为类囊体(thylakoids,来自希腊语“袋状裤”);它们又呈堆积排列,称为基粒。基粒之间配对的膜,称为基粒间片层。类囊体和基粒间叠片的膜,含有叶绿体的光合色素以及原发性光反应所需要的酶;在功能上它们相当于线粒体的嵴。叶绿体的内膜系统可以被打碎并洗除基质,以产生重新封闭的类囊体和基粒,用差速离心分离可以回收它们。如适当地补充,这些制备物就能进行光反应的光合作用。

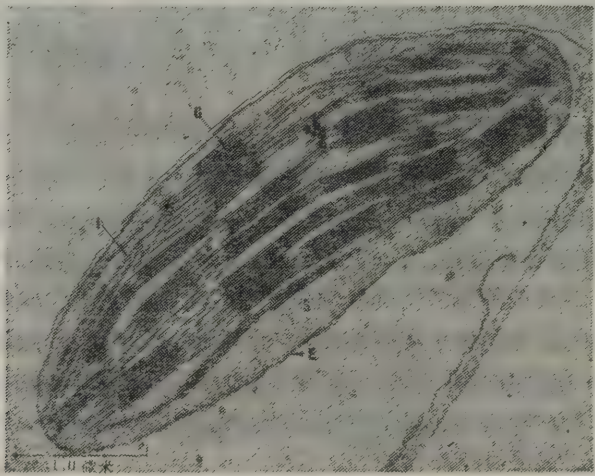
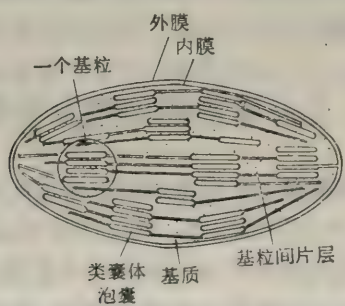


图 22-1 莴苣 (*Lactuca sativa*) 的一个叶绿体的电子显微镜相片。  
G = 一个基粒; I = 基粒间片层; S = 基质; E = 包膜或外膜。



一个叶绿体的图解,它表示了类囊体内各种膜的排列。虽然有时可把类囊体看成盘状,而实际上它们呈泡囊状。研究发育中的叶绿体证明,类囊体泡囊是从内膜上衍生而成。

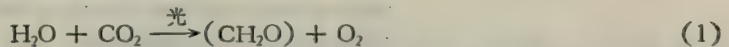


A large, dark, textured circular object, possibly a fossil or a rock sample, shown in a close-up view. The surface is highly irregular and granular, with a central dark spot. The object is set against a lighter, textured background.

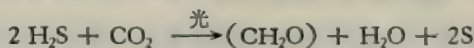
图 22-2 一种光合型原核生物的电子显微镜照片。

## 光合作用的基本过程

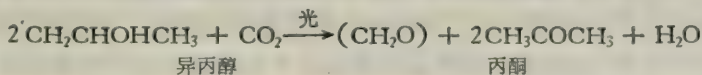
除细菌之外，所有光合型生物都能利用水作为电子或氢的供体，以还原各种电子受体，并从水放出分子氧。这一类生物的光合作用的总方程式是：



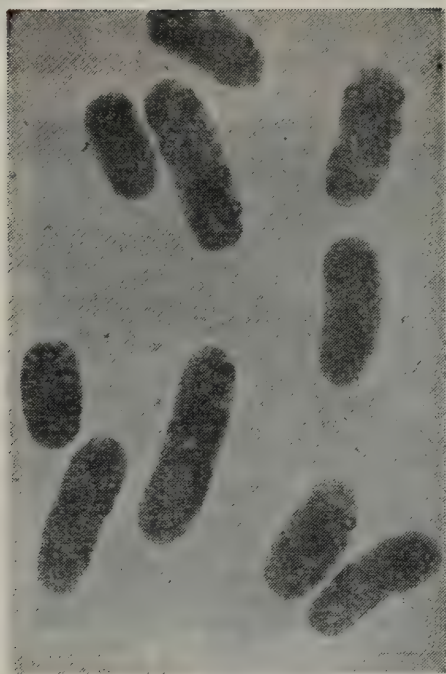
上式中  $(\text{CH}_2\text{O})$  指光合作用所形成的终产物——糖。但是此方程式并不适用于所有的光合型生物。光合型细菌通常既不产生分子氧,又不能利用分子氧;事实上,它们大多数是严格的厌氧菌,而且还会受氧的毒害。这些生物能利用其他化合物来代替水作为电子供体,绿硫细菌和紫硫细菌就是按照下列方程式利用硫化氢的:



所形成的元素硫沉积为小球,或聚存在细胞内或从细胞中排出(图 22-3)。一些不需硫的紫细菌可利用有机的供氢体,例如异丙醇,后者被氧化成丙酮:



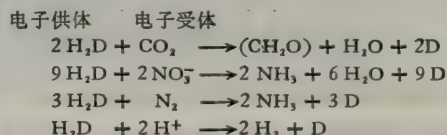
从比较的角度来研究代谢和光合作用, C. Van Niel 是一个先行者。不管存有上述这些差别, 他仍然假定, 植物和细菌的光合作用是基本相似的。如果将光合作用的方程式



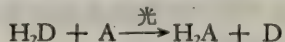
10 微米

图 22-3 需硫紫细菌。H<sub>2</sub>S 是这些细胞中的电子供体。释出的硫聚积成细胞内可见的小球。

子受体,将它还原成氨。在固氮的光合型生物中,可以利用分子氮及二氧化碳作为进行光合作用时的电子受体,而氮则被还原成氨。此外,许多光合型生物能利用氢离子作为最后的电子受体,从它们形成分子氢;还有其他的光合型生物能利用硫酸盐作为电子受体。用不同的电子受体进行光合作用的典型方程式如下:



根据以上这些看法,显然随着光合型生物的种属不同,光合作用可能涉及各类电子供体和电子受体。因此我们可以写出一个完全通用的光合作用方程式:



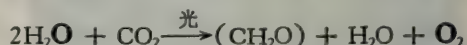
式中 H<sub>2</sub>D 是电子或氢的供体, A 是电子或氢的受体。因此我们不应该把光合作用只看成是由二氧化碳合成糖的一种机制。确实,甚至在高等植物,可以利用光反应的产物(ATP 和 NADPH) 去进行除糖以外的许多细胞组分的生物合成。

我们现在来讨论光合作用中光反应的一个高度重要的特性。在所有光合型生物中,不管其电子供体和电子受体如何,光所诱发的从电子供体流向电子受体的电子流,是逆抗电子供体和受体系统的标准氧化还原电位的正常梯度而流动;也就是说,净电子流是朝着标准电位较低或显示较强电负性的系统的那一方向流动。在光合作用中,电子流的方向并未

写成更为通用的形式,这一点就明显了:



式中 H<sub>2</sub>D 代表一个供氢体, D 为其氧化型。因此 H<sub>2</sub>D 可以是水、硫化氢、异丙醇或许多不同的供氢体中的任何一种。所能利用的供氢体的性质,随光合型生物的种属而异。Van Niel 又预测,正如以下改写的方程式(1)所示,植物进行光合作用时产生的分子氧,一定只能从水分子中的氧原子得来,而不是从二氧化碳得来:



在以氧的一种同位素标记的水进行光合作用,实际上可生成标记的 O<sub>2</sub>。

从比较的角度来研究光合作用同样证明了,在所有的光合型细胞中,二氧化碳并不是通用的电子或氢的受体。而在所有的光合型自养生物(如高等植物)中,它们必须利用二氧化碳来制造其全部有机的生物分子,二氧化碳自然成为它们的主要电子受体。然而,大多数高等植物也可利用硝酸盐作为电



违反热力学定律。因为所吸收光的能量可引起电子朝相反方向流动,也就是朝着电负性更强或更高能态的方向流动,与呼吸作用中电子流的方向相反。

## 光反应和暗反应

我们已知,光合作用有两个时相,即直接依赖光能的光反应和可以在无光情况下发生的暗反应。有人观察到,植物光合作用的限速步骤是一些能在暗中发生的步骤。而正是通过这些观察,才首先提出了上述两个时相的区分。当光合型生物受到间断照明时,即先施加极短暂的闪光(毫秒或更短),继以不同时程的暗间隔,只有在  $10^{-5}$  秒的单次闪光照明后随之以更长的暗周期(大约 0.06 秒或较长),才可以实现最大的放氧量。当降低细胞的温度时,更应强调这种速率的差异。

1958 年 Arnon 及其同事完成了一个较直接的实验,证明光合作用有光相和暗相。他们还发现,光相和暗相可以短暂地分开。第一,他们在缺乏二氧化碳的条件下光照叶绿体,结果是以化学能形式捕获了某些光能。然后他们使叶绿体裂解,移除发生捕光反应的基粒,并往剩余的基质中加入放射性  $\text{CO}_2$ 。他们发现,在暗中二氧化碳靠消耗前一光照周期内产生的化学能,可转化为放射性己糖。这些实验也表明,叶绿体能进行可导致己糖形成的整个光合过程;也就是说,正如线粒体是完全的呼吸单位那样,叶绿体是完全的光合单位。

今天我们已知,光合作用的光反应主要负责将光能转变为 ATP 和 NADPH 形式的化学能;而暗反应则涉及利用 ATP 和 NADPH 的化学能,以使  $\text{CO}_2$  还原成己糖和其他产物。暗反应这一词不应指它们只能在暗处或夜间发生;在生活植物中,它们可以和光反应一起在白天发生。夜间,绿叶细胞利用氧进行呼吸,并消耗了通过白昼光合作用生成的葡萄糖和其他有机燃料。

现在,我们将分析植物把光能转变为 ATP 和 NADPH 的化学能的各步反应。

## 光对分子的激发

可见光是一种波长为 400—700 毫微米的电磁辐射(图 22-4)。光所具有的性质提示,它是以光子或量子的形式,以不连续或微粒的方式进行传播。以光子形式投射到地球表面的太阳能,其总量是极大的;估计它超过  $2 \times 10^{25}$  卡/年。实际上,此能量仅有 12% 可被植物界所利用;其余的太阳能不是在可见范围之外,就是被空气或地球表面的非生命部分所吸收。

现用  $h\nu$  代表一个光子所含的能量,  $h$  是普朗克常数( $1.58 \times 10^{-34}$  卡·秒),  $\nu$  是辐射的频率。 $E$  是 1.0 爱因斯坦能量千卡数,即含有  $6.023 \times 10^{23}$  (阿伏伽德罗数目)个量子的 1.0 克分子光能,它可用最简单的公式表示:

$$E = \frac{28,600}{\text{波长(毫微米)}}$$

在可见光范围内,随光的波长不同,1 个爱因斯坦含有 40—72 千卡的能量(图 22-4)。在光谱紫色端,短波光光子含有最大的能量。必须注意,不管波长如何,一个“克分子”光子的

波长(毫微米)	颜色	千 卡	千 焦 耳
700	深红	40.9	171
600	红 橙	47.7	199
500	黄 绿	57.2	239
400	蓝 紫	71.5	299

图 22-4 在不同波长时的 1 爱因斯坦能量

能量比从 ADP 和磷酸合成 1 克分子的 ATP 所需的能量要大得多,后者在标准热力学条件下需要 7.3 千卡。

一个化合物吸收光子的能力,决定于它的原子结构,特别是它的原子核周围的电子排列。一个化合物的吸收光谱,表示其吸光能力为波长的函数。当一个光子撞击一个能够吸收一定波长光的原子或分子时,能量即被某些电子所吸收,从而使这些电子提升到较高的能量水平;于是,这一原子或分子将进入高能态的受激态。仅有某些波长的光子能激发一定的原子或分子,因为分子的激发是不连续的,而是量子化的,也就是光能只可以在全或无的基础上被吸收到分散的部件中,因而称为量子。光对一个分子的激发是很快的,一般少于  $10^{-12}$  秒。受激分子有两种可能的去向。它可以回到其原来的低能状态,即基态,同时将受激发时原先吸收的能量发射出来,重现为光能、或热能、或这两者。受激分子发射出来的光称为荧光,受激分子发生荧光衰变的波段较激发波长为长,它在少于  $10^{-8}$  秒内即可完成。然而,受激分子还有另外可能的去向;由于它具备高能的条件,很易与某些其他分子起反应。在这样一种光化学反应中,受激分子可以丢失一个电子给其它反应分子。

在这一叙述的基础上,现在我们将检查光合型细胞特有的吸光色素。正是当这些分子被光照时,它们即转入激发和高能状态。

## 光 合 色 素

所有的光合型细胞都含有一种或多种称为叶绿素的色素,它们大多数是绿色的。但不是全部光合型细胞都是绿色的,例如,随种属的不同,光合型藻类和细菌可以呈绿色、褐色、红色或紫红色。颜色的多种多样,是因为大多数光合型细胞除含有叶绿素外,还含有一种或多种辅助色素,这包括红色或紫红色的类胡萝卜素和蓝色或红色的藻胆色素。

### 叶绿素

叶绿素通常与特殊的蛋白质缔合,用乙醇或丙酮可以从叶子中提取,并通过层析将其纯化。实际上,层析这一术语(希腊文意指“色写”)首先是俄国的植物学家 Либет 采用,他描述了在惰性吸附剂柱上吸附、展层和洗脱,可以把用丙酮从植物中抽提出来的色素进行分离。今天,“层析”一词可用来描述借助于两相之间的分配以分离有色或无色的任何物质的过程。高等植物含有两种形式的叶绿素,称为叶绿素 a 和叶绿素 b。1940 年, Fischer 在德国用降解研究法确定了叶绿素 a 的结构。1960 年, Woodward 通过全合成实验对此



给予明确的肯定。叶绿素 a (图 22-5) 是一种镁-卟啉络合物；其卟啉与原卟啉有两点差别：即两者的吡咯环取代基的性质与位置不同；另一事实则是，它含有一个环戊酮稠环。环内的四个中心氮原子与  $Mg^{2+}$  通过配价键连接，形成一种非常稳定的基本上呈平面的络合物。叶绿素也有一条长的疏水性类萜侧链，该侧链是由一种醇——植醇与第 IV 环上一个丙酸取代基酯化而形成 (图 22-5)。当用水解酶——叶绿素酶，从叶绿素 a 上除去植醇时，留存的结构称为脱植基叶绿素 a，它是叶绿素生物合成的一个中间产物。

溶解在丙酮中的纯叶绿素 a 在 663 和 420 毫微米波长处显示最大的吸收。然而，完整细胞内的叶绿素 a 则可在较长的波长处显示几个不同的最大吸收，典型的最大吸收在 660、670、678 和 685 毫微米处出现。这些最大吸收并非由于存在有不同分子形式的叶绿素 a，但是它代表了叶绿素 a 分子与植物细胞内特殊蛋白质相聚或结合的不同状态所引起的光谱移动。

产氧的光合型细胞含有两种叶绿素，其中的一种总是叶绿素 a。而在绿色植物，第二种叶绿素是叶绿素 b；在褐藻、硅藻类和横裂甲藻类，则是叶绿素 c。不产氧的原核光合型细胞，不含有叶绿素 a。它们含有细菌叶绿素 a 或细菌叶绿素 b；此外，绿色细菌含有绿硫细菌叶绿素。细菌叶绿素 a 不同于高等植物的叶绿素 a，它的吡咯环 I 含有一个乙酰基，而吡咯环 II 已被还原。所有的叶绿素能有效地吸收可见光，这是因为它们含有许多共轭双键。此外，被一个叶绿素分子所吸收的光子的光能，可以变为不局限于一处而传遍受激分子的整个电子结构 (详见下文)。

光合作用的光化学作用光谱是一种由不同波长的可见光促进放氧的效应图谱。由观测这种图谱已经确定，叶绿素是大多数绿色细胞中的主要吸光色素。图 22-6 表示了一种绿色植物中光合作用的作用光谱与其光合色素的吸收光谱。此作用光谱与叶绿素和类胡萝卜素的吸收光谱之和十分一致 (见下文)。然而在大部分可见光范围内，作用光谱可以反映叶绿素 a 和 b 的吸收光谱。从这些证据已能作出结论，叶绿素是绿色植物细胞中的主要捕光分子。在许多植物细胞内，如与其吸收光谱比较，发现位于光谱远红区的作用光谱 (680 毫微米以上) 急剧下降。正如我们将讨论的那样，此现象是鉴定绿色植物中不同类型光合

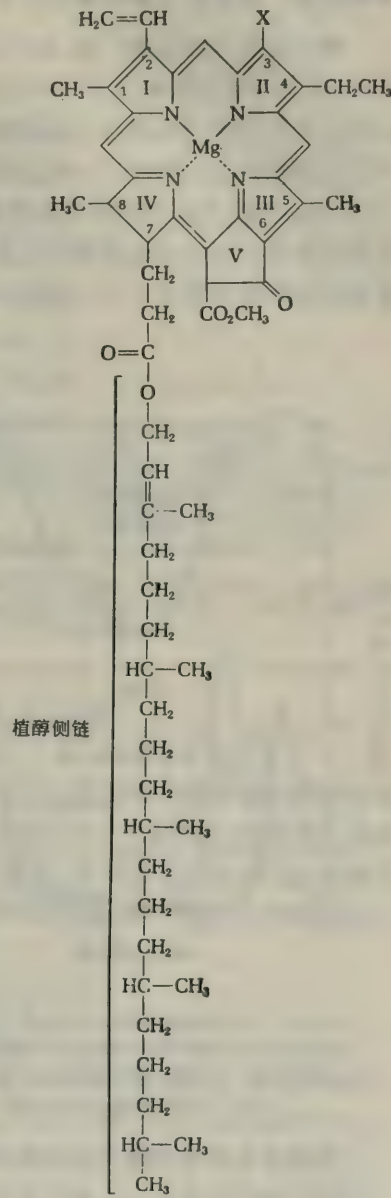


图 22-5 叶绿素类的结构。在叶绿素 a 中， $X = -CH_3$ ；而在叶绿素 b，则  $X = -CHO$ 。注意除四个吡咯环外，还有一个环戊酮稠环 (V)。细菌叶绿素的第 II 个吡咯环已被还原。当同植醇相连的酯键被水解时，就生成一个脱植基叶绿素。

系统的一个重要线索。

### 辅助色素：类胡萝卜素和藻胆色素

辅助色素与叶绿素一样，也可以作为光能的受体。它们包括类胡萝卜素和藻胆色素。例如，红藻含叶绿素较少，但含有相当量的藻红素(phycoerythrin)——一种红藻胆色素。红藻的光化学作用光谱与其红藻胆色素-蛋白质结合物的吸收光谱大多是一致的，表明这种结合物是该生物体内的一种主要吸光色素。因为这种辅助色素显示最大光吸收的波长不同于叶绿素，故它们可作为尚未被叶绿素完全吸收的那部分可见光谱的补充光受体。但是无论光能于何时被这些辅助色素吸收，在它用于光合作用以前，必须作为一种激发能量被传递到叶绿素分子上。因此叶绿素是光合装置中不可缺少的成分。

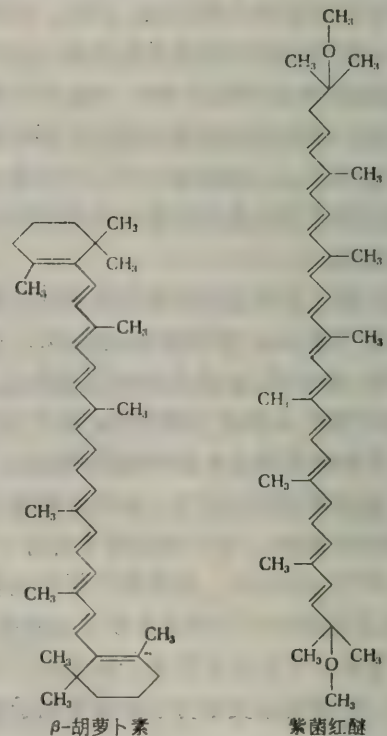
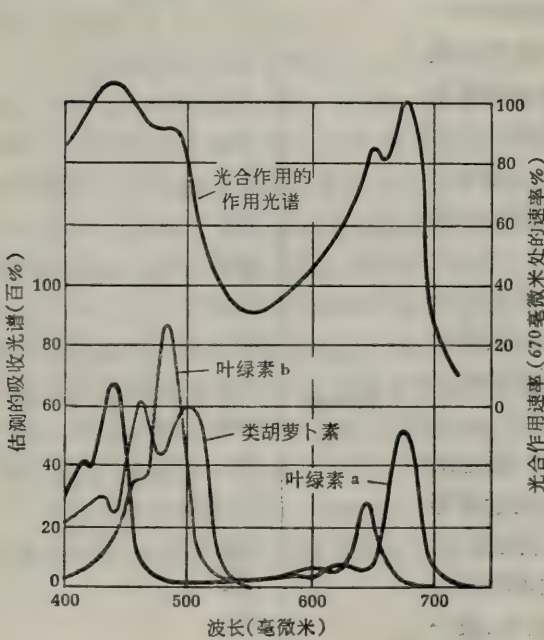


图 22-7  $\beta$ -胡萝卜素和紫菌红醚的结构

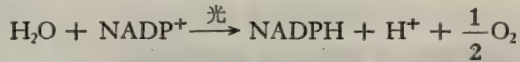
类胡萝卜素是一种具有共轭双键的长的聚类异戊二烯分子；其分子的每一端由一个不饱和的取代的环——己烯环所组成。在叶绿体内，共有两类主要的类胡萝卜素：胡萝卜素属类异戊二烯烃，不含氧；而叶黄素具有非常相似的结构，但在它们的末端环上却含有氧原子。图 22-7 表明了  $\beta$ -胡萝卜素（一种最丰富的胡萝卜素）和紫菌红醚（一种叶黄素）的结构。

藻胆色素存在于红藻和蓝藻内，但不存在于高等植物。与叶绿素的环状四吡咯结构不同，藻胆色素是直链的四吡咯环(图 22-8)，缺少结合的  $Mg^{2+}$  是它的另一差异。藻胆色素与特殊蛋白质结合。藻红素的蛋白质结合物是藻红蛋白(phycoerythrin)，它是红藻的主要红色素。蓝色的藻青蛋白(phycocyanin)则是蓝藻内发现的类似结合物。





反应中,一种人工受体于电子到达二氧化碳前就阻止了它们。这一看法意味着,叶绿体必然含有能引导电子从水到达  $\text{CO}_2$  的电子传递体。1951 年有三组研究者报告,  $\text{NADP}^+$  这种叶绿体的正常成分能代替人工的 Hill 试剂作为电子受体。当在光照下与叶绿体保温时,即可按下列方程式起反应,  $\text{NADP}^+$  被还原成  $\text{NADPH}$ , 并且放出氧。



在暗期,未发生  $\text{NADP}^+$  的还原。于是,在其特异性脱氢酶的作用下,光反应期生成的  $\text{NADPH}$  能用来使需要  $\text{NADP}$  的底物还原。根据这些和其他的观察,已确认  $\text{NADP}^+$  可以担任从水到光合作用的各种末端电子受体的共同电子载体,而绿色植物的这种末端电子受体是  $\text{CO}_2$ 。通过从水或其他的电子供体到各种电子受体的一些电子传递分子而出现的光诱发性电子移动,叫做光合型电子传递。

$\text{NADPH-NADP}^+$  偶联的标准氧还电位值为  $-0.32$  伏,我们可以将它与水-氧偶联的标准电位值  $+0.82$  伏比较。正常情况下,电子当然具有从  $\text{NADPH}$  流向氧的趋势,亦即朝较正值系统的方向流动。但在光合型电子传递,电子却被诱发朝相反的方向流动,即从水到  $\text{NADP}^+$ 。

有一些其它电子载体参加了水与  $\text{NADP}^+$  之间的光合型电子传递。待我们讨论了光合作用中光反应的其他主要高能产物(即  $\text{ATP}$ ) 的生成以后,就会描述这些载体。

## 光合磷酸化作用

1954 年 Arnon、Allen 和 Whatley 发现,若有  $\text{ADP}$  和磷酸存在时,光照离体菠菜的叶绿体能引起  $\text{ATP}$  的形成。由于这样的实验生成的  $\text{ATP}$  量颇多,而且不亚于光诱发性电子流的相应幅度,故可作出结论:  $\text{ATP}$  的形成必定代表一种保存所吸收光能的主要机制,正如象  $\text{ATP}$  的形成可作为线粒体内电子传递时保存呼吸能量的主要过程一样。这一过程称为光合磷酸化作用或简称为光磷酸化作用。几乎与此同时, Frenkel 也独自发现,若对光合型细菌的膜囊泡进行光照,即出现一非常相似的磷酸化作用。这些观察也表明,磷酸化作用同光诱发性电子传递过程的能量偶联,导致了从  $\text{ADP}$  及磷酸形成  $\text{ATP}$ 。此反应同线粒体内氧化磷酸化作用与电子传递相偶联的方式大致相同。

在我们讨论了叶绿体吸光色素系统的功能与从水到  $\text{NADP}^+$  的电子流途径之间的基本关系以后,我们将转入对参加光诱发性电子流的电子载体,以及光合磷酸化的作用机制等内容的较详细叙述。

## 植物光合作用的两类光反应

目前已知,在放氧的植物光合作用中有两类光反应。对某些植物光合作用的光化学作用的光谱研究,导致了这一结论。我们已看到(图 22-6),某些植物的大部分可见光谱在吸收光以促进光合作用的效率方面与其细胞色素的吸收光谱是一致的。然而在大多数植物细胞,如同细胞的吸收光谱比较,则发现远红区(大于  $680$  毫微米)的光效率急剧下降,这现象称为红降(图 22-9)。Emerson 证明,  $710$  毫微米处的光照不能单独极有效地



促进光合作用,但如用 670 毫微米的光加强此光照,即可大大增强 710 毫微米处光合作用的效率。这些发现提示,想获得最大的光合效率,需要各具有一特定最适波长的两类不同的光反应。为解释这项及其它观察结果, Duysens 假定,在 710 毫微米附近显示最大效率的长波长系统(他称之为光合系统 I),与那些在较长波长吸光的叶绿素 a 形式有关,而且它不担负放氧;另一方面,光合系统 II 能被较短波长(670 毫微米及更短)激活,它又是放氧所需要的。所有放氧的光合型细胞都含有光合系统 I 和 II,而不放氧的光合细菌则仅含有一种类似植物光合系统 I 的单个光合系统。也已假定,在生物进化过程中,光合系统 I 首先发生;光合系统 II 与植物利用水作为还原剂而引起放氧的能力有关,但此能力出现较迟。关于这两种光合系统之间的关系,以及支持它们之间存在功能差异的其他证据,将在以后叙述。

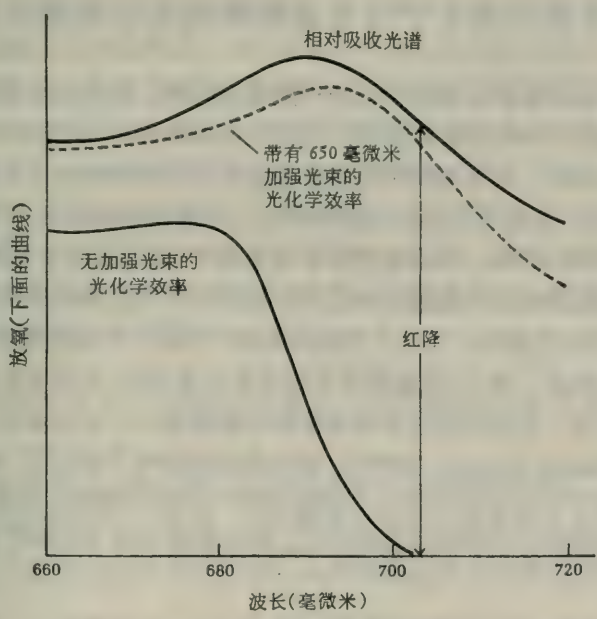


图 22-9 一种绿藻——小球藻的红降。在约 680 毫微米以上,即光谱的红色区,相对于主要由叶绿素产生的吸收光谱,单色光协助放氧的效率明显降低。这种效率损失称为红降。然而,如投入 650 毫微米的加强光束,即可恢复较长波长的效率。现共有两个吸光系统,一个在 680—720 毫微米范围内吸光,而另一个在较短波长内吸光。因此,这两者必须进行协作,以产生光合作用的最大速率。

现在,我们将检查这两种光合系统的某些不同组成。每一种光合系统都有它自己特有的吸光色素分子组合或装置,这些装置起着象“天线”的作用,以吸收和传送光能。虽然两种光合系统都含有叶绿素 a 和叶绿素 b,而光合系统 I 的叶绿素 a 和 b 之比却高于光合系统 II。但是两种光合系统之间较显著的差别是,光合系统 I 中存在有大量在长波长区吸光的叶绿素 a-蛋白质络合物,而在光合系统 II 则不含有。正是这种差别引起了红降。两种光合系统必须为实现高速率的放氧型光合作用而发挥其功能。在高等绿色植物中,其光合系统 I 的色素装置或光合单位含有 200 个左右的叶绿素 a 分子(特别属于长波长类型),随植物种属不同,还含有或许 50 个叶绿素 b 分子,50—200 个类胡萝卜素色素分子,以及单个 P 700 分子。在这一光合单位的任何地点,无论由一个类胡萝卜素或一个叶绿素分子所吸收的光能,其一个量子可以通过一组色素分子移动(这一过程称为激子传

递),直到它抵达单个 P 700 分子为止。而 P 700 则可接受激子,并因此丢失了一个含有大量能量的电子。光合系统内的光子捕获与激子传递都是极迅速的过程,而且象所有光化学过程那样,它们对温度不太敏感。在其他的光合系统中,也发生了一种类似的光子捕获和激子传递过程,直到激子抵达光合系统 II 的反应中心——P 680。后者接着丢失一个电子。

光合系统 I 和 II 的色素装置,埋藏在类囊体囊泡的膜中。光合系统 I 和 II 的膜结构,似乎具有不同的物理特性;因为用毛地黄皂苷或其他去垢剂处理叶绿体,随后再通过密度梯度的分级分离,可以生成两个膜部分,一个富含光合系统 I,而另一个则富含光合系统 II。

## 非循环的电子流与非循环的光合磷酸化作用

现在我们必须考虑前面讨论引出的一些重要问题。两种光合系统的功能是什么?绿色植物的光合系统 I 和 II 的关系如何?它们是各自起作用,还是彼此相关?

为回答这些问题,最简单的是检查光合型电子传递过程的主要轮廓。正如我们今天所知,这轮廓的绘出来自几条不同线索的研究。用最简单的说法,在从水(供电子体)伸延到  $\text{NADP}^+$  (受电子体)的一个连续的电子传递链中,光合系统 I 和 II 是释放能量的组分。为强调它与线粒体的电子传递链的相似点,图 22-10 将这条传递链以线形表示。正如以前已指出,我们首先注意到,当电子沿着从水到  $\text{NADP}^+$  的光合链流动时,其方向恰与线粒体的电子传递相反。第二,也象线粒体的电子传递那样,光合电子传递链含有颇多数目的电子载体。然而,主要的差别是存在两种色素系统——光合系统 I 和 II。这两者能起电子强化剂 (Electron boosters) 的作用,利用光能推动电子通过从  $\text{H}_2\text{O}$  到  $\text{NADP}^+$  的一系列载体。光合电子传递链具有三个功能分段:从  $\text{H}_2\text{O}$  到光合系统 II 的较短分段;从光合系统 II 到光合系统 I 的中央分段;以及从光合系统 I 到  $\text{NADP}^+$  的分段 (图 22-10)。

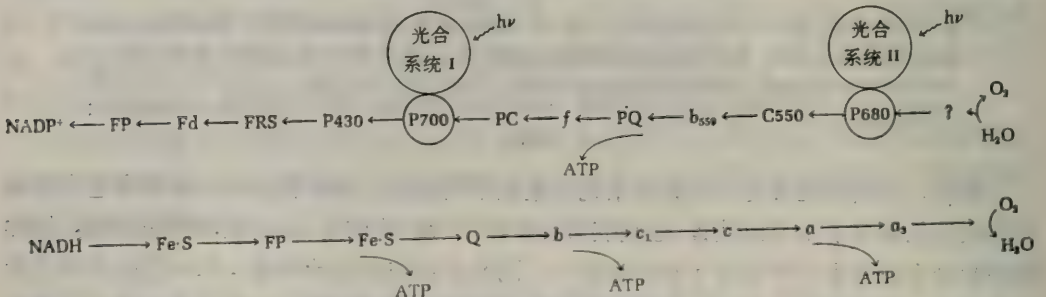


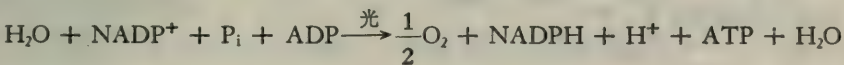
图 22-10 (右侧) 光合电子传递链,显示电子通过一序列电子载体(见下解说)从  $\text{H}_2\text{O}$  流向  $\text{NADP}^+$ 。需要的能量来自推动电子流向  $\text{NADP}^+$  的两种光合系统所吸收的光量子 ( $h\nu$ )。光合电子传递链可分为三段,由两种光合系统隔开。在中央的分段从 P 680 到 P 700 的电子流为 ATP 的形成提供能量。现列出线粒体的呼吸链以供比较。在该链中,电子流沿着从 NADH 到氧的方向前进。(也可参阅图 15-14)

注解:  $\text{C}_{550}$  = 细胞色素  $\text{C}_{550}$        $\text{P}_{430}$  = 色素  $\text{P}_{430}$   
 $\text{b}_{559}$  = 细胞色素  $\text{b}_{559}$        $\text{FSR}$  = 铁氧还蛋白-还原物质  
 $\text{PQ}$  = 质体醌       $\text{Fd}$  = 铁氧还蛋白  
 $\text{f}$  = 细胞色素  $\text{f}$        $\text{FP}$  = 铁氧还蛋白- $\text{NADP}^+$  还原酶  
 $\text{PC}$  = 质体蓝素



现在,让我们来追踪沿着从水到  $\text{NADP}^+$  的这条链发生的电子流。当光子被光合系统 I 的色素分子所吸收,即可引起其激发,生成的高能激子为 P700 捕获;因此从 P700 丢失的电子将被传递到它的第一级电子受体——一种称为 P430 的色素。这些电子经由一条电子载体链(其特性见下文叙述)流向  $\text{NADP}^+$ ,使其还原而生成  $\text{NADPH}$ 。每一个  $\text{NADP}^+$  分子的还原,当然需要两个电子。但是从 P700 丢失一个电子,将留下氧化型的  $\text{P700}^+$  (缺少一个电子)。如用一恰当的术语描述, P700 被留下了一个电子穴。从光合系统 II 延伸到光合系统 I 的电子载体的中央链,可以提供填满该穴所需要的电子。但是只有光合系统 II 依次被光照而转入激发后,电子才能用于 P700 的还原。激发能从而由 P680 捕获, P680 再向其第一级受体(称为 C550)丢失一个电子,留下氧化型 P680 或  $\text{P680}^+$ 。从 P680 丢失的电子可沿着电子载体的中央链流到光合系统 I 中  $\text{P700}^+$  的电子穴内,使  $\text{P700}^+$  恢复其还原态。然而光合系统 II 的  $\text{P680}^+$  现在也必须恢复到还原态。通过另一条性质尚不清楚的电子载体链,由一个水分子供给此时所需要的电子。从水移除电子将引起分子氧的放出。这种单向的从水到  $\text{NADP}^+$  的光诱发性电子流,叫非循环的光合电子传递。一分子水提供了使每分子  $\text{NADP}^+$  还原所需要的那两个电子。

图 22-10 也表明, ADP 磷酸化生成 ATP 的过程与电子从水朝  $\text{NADP}^+$  的流动相偶联;此磷酸化作用局限在从光合系统 II 通往光合系统 I 的中央链上。每一对电子从光合系统 II 传递到光合系统 I 究竟会生成一分子还是两分子 ATP,则未能确知。总之,如我们假定只发生了一次磷酸化作用,我们就能用以下总方程式代表伴有偶联磷酸化作用的从  $\text{H}_2\text{O}$  流向  $\text{NADP}^+$  的光合电子流:



位于方程式左侧的水分子是使  $\text{NADP}^+$  还原所需两个电子的供体和以  $\frac{1}{2}\text{O}_2$  释出的氧原子的供体。方程式右侧的水分子,来自 ADP 和磷酸生成 ATP 的反应。虽然这些水分子可以删去,我们还是把它们留在方程式中,以表明光合电子传递的全部输入和支出。

## 光合电子传递中的能量关系

为阐明光能如何被利用来产生从  $\text{H}_2\text{O}$  到  $\text{NADP}^+$  的电子流以及 ADP 的光合磷酸化,我们现在列出光合电子传递链。在图 22-10 中,它是通过说明能量关系的方程式以线形表示的。图 22-11 则是根据光合电子传递链中最初反应物、最后产物以及各种电子载体的标准氧还电位,绘出光合电子从  $\text{H}_2\text{O}$  往  $\text{NADPH}$  转移的能量变化图解。

首先应当注意,由输入光合系统 I 和 II 的光能可引起两次大强化,而在一条以这种强化为特征的通路中,电子在能量水平上从水-氧系统的电正性标准氧还电位 (+ 0.82 伏),升达  $\text{NADPH-NADP}^+$  系统的电负性电位 (- 0.32 伏)。

处于基态的 P700 具有一较正的标准氧还电位(据认为大约在 + 0.40 与 + 0.50 伏之间);因此它丢失一个电子的倾向很小。然而在它被光能的吸收激发以后, P700 的标准电位变得更负,亦即变得较为高能。因此, P700 对一个激子的吸收,可将一个电子从低能形式提升到高能形式。这样,在通过从激发的 P700 延伸到  $\text{NADP}^+$  的电子载体

链(参阅图 22-11)而出现的一种“下坡”流动中,上述那个电子具有的“压力”或能量就比足够使  $\text{NADP}^+$  还原的水平 ( $E'_0 = -0.32$  伏)还高。同样,光合系统 II 对光量子的吸收,可将一些电子从 P 680 的低能水平提升到高能水平,所以它们现在能从激发的 P 680 经由中央的电子传递链下坡流动到已去激发的 P 700<sup>+</sup>。一些电子从水下坡流动到极高电正性的已去激发的 P 680<sup>+</sup>,从而完成了这一过程。当一些电子经由受激的光合系统 II 下坡流往光合系统 I 时,ADP 通过偶联的光合磷酸化作用生成了 ATP。在一对电子从光合系统 II 的第一级电子受体 ( $E'_0$  约为  $-0.05$  伏)流向已去激发的 P 700 ( $E'_0$  约为  $+0.4$  伏)的过程中,有充足的能量可供利用,至少可用它来偶联合成一分子 ATP,此时需要的 7.3 千卡相当于大约 0.16 伏的标准电位之差。

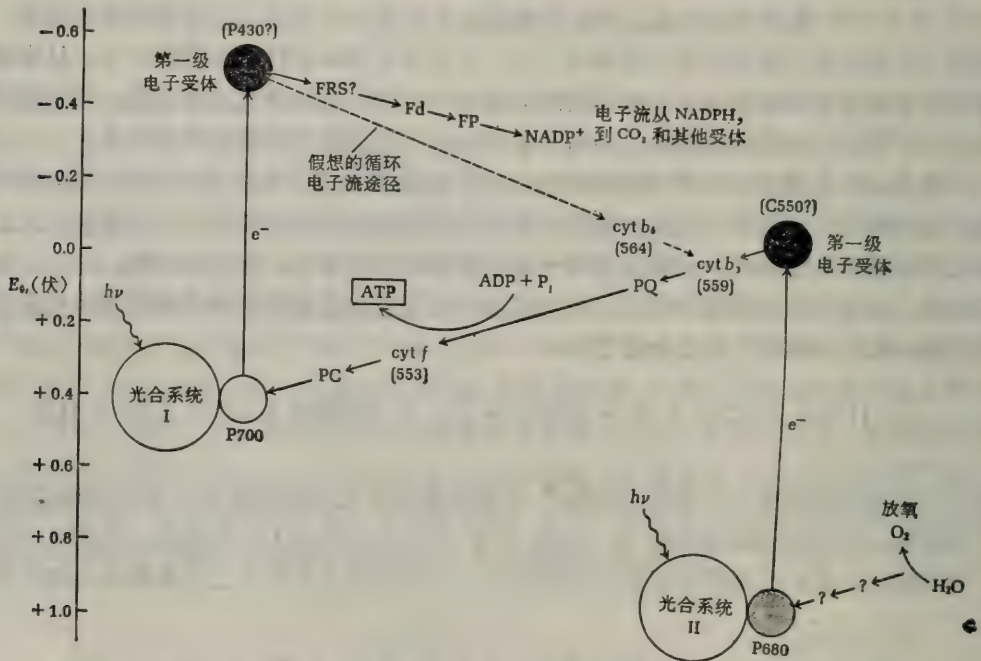


图 22-11 经由光合系统 I 和 II 发生的光合电子传递的能量变化图解,根据相互作用的氧还偶联的标准氧还电位 ( $E'_0$ ) 绘制。各电子载体符号的含义已在图 22-10 中规定。此图常称 Z 图解。这两个系统是由位于光合系统 II 的第一级电子受体和光合系统 I 的 P 700 之间的一条中央电子传递链连接起来的。非循环的电子流利用此两系统,始于水而终于 NADPH。循环电子流仅需要光合系统 I; 电子被提升到光合系统 I 的第一级电子受体 (P 430) 后,可经由细胞色素  $b_6$  或一种人工的电子载体如硫酸甲酯吩嗪所提供的分路而回到 P 700<sup>+</sup>。此分路的入口点尚未未知,光能的吸收 ( $h\nu$ ) 可将一些电子提升到较高的能量水平。ADP 经磷酸化生成 ATP 的反应,与中央链的电子流相偶联。关于每一对电子会生成两分子 ATP,已有越来越多的证据。

在每一光合系统中,只有一种真正的赖光反应,即吸收一个光子并将其能量传递到 P 700 (或 P 680) 的反应,它伴有高能电子往第一个受体的移位。这些电子接着可以在暗中沿电子传递链通过。因此,涉及图 22-10 和 22-11 中所示的整套反应,传统使用的名称“光反应”实际上是不准确的,因为唯一需要光的反应是 P 700 和 P 680 丢失电子的那些步骤,而其余的电子传递步骤都能在无光时发生。

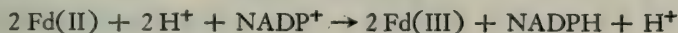
现在,我们将讨论参与光合电子传递的电子载体的特性和顺序。



## 电子从光合系统 I 传递到 NADP<sup>+</sup>

1958 年 San Pietro 和 Lang 发现,添加从菠菜分离出来的一种可溶性蛋白质,可以大大加速光照过的菠菜叶绿体悬浮液还原 NADP<sup>+</sup> 和放氧的作用。他们还证明,这个因素是一种能促进电子转移到 NADP<sup>+</sup> 的酶,称之为光合吡啶核苷酸还原酶。后观察到,此酶的高度纯化制剂含有不稳定形式的铁和硫。不久,Arnon 及其同事从非光合型厌氧的巴氏梭状芽孢杆菌提出了一种铁-硫蛋白——铁氧还蛋白 (ferredoxin) 的晶状制剂,发现它在菠菜叶绿体中也能极活跃地促进 NADP<sup>+</sup> 的光还原作用。这一观察提示,一种类似细菌铁氧还蛋白的铁-硫蛋白是从光合系统 I 传递电子到 NADP<sup>+</sup> 的组分之一。Arnon 及其同事最后从菠菜叶分离出一种晶状铁氧还蛋白。它的分子量约为 11,600,并含有同两个硫原子结合的两个铁原子。象其他铁-硫蛋白一样,菠菜铁氧还蛋白也以 Fe(II) 和 Fe(III) 型存在。它的氧化型或 Fe(III) 型在可见光谱的 463 和 420 毫微米处显示两条强烈吸收带,而还原可使两带的强度减弱。它的标准氧还电位在 pH 7.0 时是 -0.42 伏,故较 NADPH-NADP<sup>+</sup> 偶联的标准氧还电位还约负 0.1 伏。

还原状态的铁氧还蛋白,不能将其电子直接传给 NADP<sup>+</sup>,但有一种能在黑暗中催化此反应的酶——铁氧还蛋白 NADP 氧化还原酶,已经从菠菜叶绿体中分离出来而且制成了晶体。它是一种黄素蛋白质,虽然它对 NADP<sup>+</sup> 的亲合力比对 NAD<sup>+</sup> 强 400 倍,但能利用 NAD<sup>+</sup> 或 NADP<sup>+</sup> 作为电子受体;在植物光合作用中,NADP<sup>+</sup> 可担任其正常受体。兹将这个反应的方程式写成:



上式中 Fd 代表铁氧还蛋白。

关于从 P 700 接受电子的第一个受体的特性,仍有一些未能肯定的地方(图 22-10 和 22-11)。由于它在还原时于 430 毫微米处显示了特有的光吸收变化,可将此有关色素称为 P 430。电子顺磁共振观测提示,P 430 是一种和铁氧还蛋白不同的铁-硫蛋白;实际上,已从叶绿体内分离出这样一种同膜结合的铁-硫蛋白。最近的测定证明,P 430 的标准氧还电位约为 -0.4 伏。已经有人提出,要使电子传递到铁氧还蛋白还需要另一个因子——铁氧还蛋白-还原物质 (FRS)。但是,FRS 可能与 P 430 是同一物质。

在光合电子传递链的这一段所形成的 NADPH,最后可用来使植物光合作用的主要电子受体——CO<sub>2</sub> 还原,以生成糖。通过各种需要 NADP 的脱氢酶催化,NADPH 也能用于其他电子受体的还原。

## 电子从光合系统 II 传递到光合系统 I

高等植物的叶绿体,含有一些其他的电子载体,它们在将电子从光合系统 II 传递到光合系统 I 的过程中发挥作用(图 22-11)。这些载体中间至少有三种特殊的植物细胞色素。1940 年由 Hill 和 Davenport 发现的第一种是细胞色素 f (拉丁语 frons 是“叶”的意思),它与叶绿体的结构牢固地结合在一起,只能用碱性的非极性溶剂才会使它释出。它的分子量约为 100,000,而且每分子含有两个血红素,其还原型的  $\gamma$  谱带位于 553 毫微米处,因

此也可以称它为细胞色素  $b_{553}$ 。它的标准氧还电位与线粒体细胞色素  $c$  的  $+0.265$  伏的数值相比, 约为  $+0.365$  伏。第二种细胞色素是细胞色素  $b_3$ , 由于它在  $559$  毫微米处显示最大吸收, 故又称为  $b_{559}$ 。第三种是细胞色素  $b_6$ , 它的功能则不甚了解。这是因为细胞色素  $b_6$  非常牢固地与叶绿体膜结构结合在一起, 以致无法制得水溶性形式。它的  $\gamma$  谱带位于  $564$  毫微米, 其标准电位为  $-0.06$  伏。叶绿体也含有一种蓝色铜蛋白, 称为质体蓝素 (plastocyanin), 它的标准氧还电位约为  $+0.32$  伏。在传递链上还有两种脂溶性的醌类, 即泛醌的一种类似物——质体醌 (plastoquinone) (图 22-12) 和维生素  $K_1$ 。

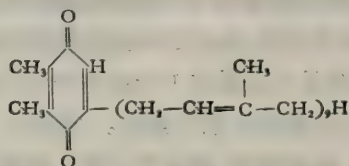


图 22-12 质体醌 A。这是植物和藻类中最富含的质体醌。其他质体醌在侧链的长度和醌环上取代基的性质这两方面有所不同。

为了阐明在光合系统 II 与 I 之间的光合电子传递链中这些电子载体的顺序, 已采用了许多分析线粒体电子转移的方法来进行探讨。根据载体的标准电位, 用光谱分析所观察到的它们相互作用的动力学和顺序, 以及抑制剂和人工电子载体的作用等资料, 就可以推导出图 22-11 中所示的传递顺序。从光合系统 II 通向  $P 700$  的这条链, 是从一个尚未鉴定的第一级电子受体开始的。光谱测定发现, 光还原作用可使它在  $550$  毫微米处显示特殊变化, 故通常称它为  $C_{550}$ 。下一个传递体认为是细胞色素  $c_{559}$  ( $E'_0 \approx +0.080$  伏)。随后就是质体醌 ( $E'_0 \approx +0.100$  伏)。细胞色素  $f$  ( $553$ ) 和质体蓝素的标准电位正一些, 能传递更多的电子; 有人提出, 质体蓝素是  $P 700^+$  的直接电子供体。分析此链中电子载体顺序的另一个实验途径是采用缺乏这种或那种载体的藻类的遗传突变种。由这些突变种得到的资料, 也支持图 22-10 中所示的链式。

## 电子从水传递到光合系统 II

关于植物中从电子供体水到光合系统 II 的  $P 680^+$  之间的电子传递, 其通路和机制尚不清楚。必须从两个水分子移去四个电子, 以生成一分子的氧 ( $O_2$ )。水的脱氢作用可能发生在两个(或多个)尚未弄清其性质的连续步骤中。已知此过程需要  $Mn^{2+}$  和氯离子。许多人工的电子供体如羟胺、联苯胺和氨基脲, 能代替水作为通向光合系统 II 的电子供体。

## 循环的光合电子传递和循环的光合磷酸化作用

绿色植物细胞中还有另一类光诱发的电子流, 即循环电子流。它不能用测定非循环电子流的方法检出, 而只能通过电子流产生的一种效应去认识, 即根据 ADP 磷酸化变成 ATP 的效应。在不添加任何电子供体或电子受体, 以及没有一种被还原物质堆积的情况下, 光照离体的叶绿体能引起 ADP 经磷酸化生成 ATP。由于没有净电子传递, 因而也



没有还原产物的聚集,从而可推断光能的吸收会引起电子从激发的光合系统 I 的 P 700, 围绕着电子载体的环形链而流动, 这样电子最后返回以还原光合系统 I 的已去激发的 P 700<sup>+</sup>, 而不涉及光合系统 II。故此过程称为环状电子流。由于电子不能在任何产物中聚集, 虽然不可能直接测定循环电子流的速率, 但是测定循环电子流所产生的 ATP 则是可能的, 这一过程称为循环的光合磷酸化作用。各种氧化-还原载体如染料绿脓菌素或黄素核苷酸等, 都能大大加强循环电子流。

现认为, 循环电子流是经分路或旁路发生的(图 22-11 和 22-13), 当不能用 NADP<sup>+</sup> 充当电子受体时旁路即发挥作用。从光合系统 I 的 P 700 射出的电子, 不流向 NADP<sup>+</sup>, 而是经旁路进入中央电子传递链(大概是经由细胞色素 b<sub>6</sub>), 再返回光合系统 I 的电子穴中。ADP 经磷酸化生成 ATP 的反应, 与这一电子流发生偶联。一种与循环系统完全无关的分隔的光合系统, 也可能会促进循环电子流和磷酸化作用。

扼要地说, 非循环电子流是出现在植物光合作用中的正常过程。它包括光合系统 I 和 II, 伴有 ATP 和 NADPH 的形成和放氧。而循环电子流只需要光合系统 I 起作用, 它不包括放氧或一个电子受体的净还原, 而只涉及 ATP 的偶联合成。循环电子流是否正常出现在活植物中则不明确。

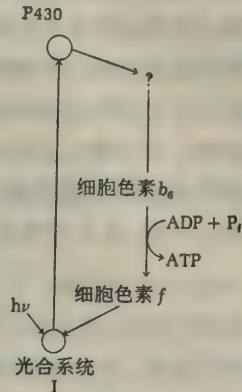
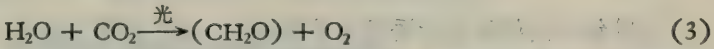


图 22-13 循环电子流与光合磷酸化作用(也可参阅图 22-11)。

## 光合作用的能学

光合作用的最大热力学效率, 亦即量子效率, 是一个著名而争论激烈的问题。原则上, 这一问题已缩小到  $n$  值的实验测定,  $n$  值是指光合作用总方程式中所需要的光量子数。从 CO<sub>2</sub> 与 H<sub>2</sub>O 合成己糖的标准自由能变化  $\Delta G^{\circ}$  是 + 686 千卡, 若将此值以 6 除之, 便得到将 1 分子 CO<sub>2</sub> 还原成 (CH<sub>2</sub>O) 所需要输入的能量, 如下列方程式所要求的, 即 + 114 千卡:



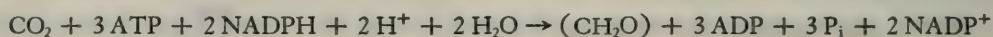
我们已知, 一个光量子的卡价取决于其波长及范围 (从 400 毫微米 的 72 千卡/爱因斯担到 700 毫微米的大约 41 千卡) (图 22-4)。如果我们取这些数值中的较低值 (41 千卡), 反应 (3) 所要求的量子数  $n$  的最低值应为 114/41, 或约为 2.7。由于光量子是不能分割的, 量子需要数必定是一个整数, 如果己糖生成所需要的全部能量来自光线, 则所需的光量子数至少为 3。

通过实验, 可测量正在进行光合作用的细胞悬浮液与 CO<sub>2</sub> 还原量及 (或) 放氧量有关的吸光量, 并由此测知光合作用对量子的实际需要量。十九世纪二十年代, Warburg 在德国第一次对  $n$  值进行了系统的测定。最初, 他发现的  $n$  值约为 5, 但许多年之后, 他用不同的技术观察到  $n$  值可低到 3。他假设, 量子产量的真实值对每分子被还原的 CO<sub>2</sub> 来说, 实际上等于 1。正如我们已知, 虽然理论上要求 3 个量子, Warburg 却提出, 所需能量的平衡来自属于一种暗过程的呼吸作用。

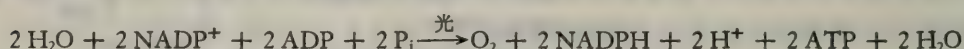
后来发现, Warburg 的假说与一些其他的实验观察不符。首先得到的大多数证据表

明,  $\text{CO}_2$  还原成己糖和放氧所需要的全部能量正常时来自光能。而且大多数其他研究者, 特别是 Emerson 发现, 在由光能充分维持的光合作用中, 其需要的最小量子数为 8。此数值相当于几乎与呼吸全过程一样的热力学效率, 即大约是 38%。

要了解量子产量为 8 的意义, 我们必须预先讨论一个将在第二十三章中全面阐述的论点, 并且把大多数绿色植物中光合作用的暗时相内  $\text{CO}_2$  被还原成  $(\text{CH}_2\text{O})$  的总方程式列于下:



在暗反应中, 每还原一分子  $\text{CO}_2$  需要供给 2 分子 NADPH。为此, 光合系统 I 将射出 4 个电子。光合系统 II 也相应地射出 4 个电子, 而由水产生 1 分子氧 ( $\text{O}_2$ )。由于射出每个电子需要 1 个光量子, 所以光合系统 I 需要 4 个光量子, 光合系统 II 也需要 4 个光量子。象许多研究者所认为的那样, 如果在全过程中每对电子只发生一次光合磷酸化作用, 则按照下列方程式, 当 2 对电子从水流到  $\text{NADP}^+$  时只能产生 2 分子 ATP:



但是我们已知, 在暗时相中, 还原 1 分子  $\text{CO}_2$  需要 3 分子 ATP。然而, 正如某些研究者所设想的那样, 如果在光诱发一对电子从水传递到  $\text{NADP}^+$  时产生了 2 分子 ATP, 则每 8 个光量子就会产生 4 个 ATP。这对于将 1 克分子的  $\text{CO}_2$  还原成糖来说就绰绰有余了。

还可以通过另一条途径以产生暗期生物合成反应所需的额外 ATP, 这就是循环的光合磷酸化作用。它能从 ADP 产生额外的 ATP, 其反应的进行与非循环电子流无关。

自然界光合作用的效率, 远较按基本分子过程计算出来的 38% 为低。从一块玉米田在一个生长季节里固定碳的数量, 已发现投射到这块田的太阳能, 以新的光合产物的形式只回收了大约 1—2%。在未经培育的植物, 其产量就更低, 或许只有 0.2%。而培育的甘蔗就高效得多; 它的产量能以有机产物的形式达到所捕获光能的 8%。在下章中将会看到, 光呼吸过程倾向于降低某些植物光合作用的净效率。

## 光合磷酸化作用的特性; 偶联因子

在叶绿体内伴随着光诱发电子传递的 ADP 磷酸化作用, 与偶联到线粒体电子传递的氧化磷酸化作用的类似过程极相象。例如, 往叶绿体中添加磷酸的受体 ADP, 能加强光诱发的非循环电子传递, 从而表明了有光诱发性电子传递的受体调节现象存在, 它与线粒体的电子传递需要 ADP 才能达到最大速度的现象相似。

象线粒体的磷酸作用一样, 某些化学试剂也能使光合磷酸化作用解偶联, 以致电子流虽能继续进行, 但不发生磷酸化。在这些解偶联剂中, 对光合磷酸化有效的是  $\text{NH}_4^+$ 、羧基氰化物苯腈; 后者对氧化磷酸化或光合磷酸化作用都有效。离子载体如短杆菌肽, 也可阻碍光合磷酸化作用。根皮苷是从梨树皮中提出的一种毒性糖苷, 它和另一种名叫 Dio-9 的合成化合物均能抑制光合磷酸化。它们的作用与寡霉素对线粒体磷酸化的作用相似。

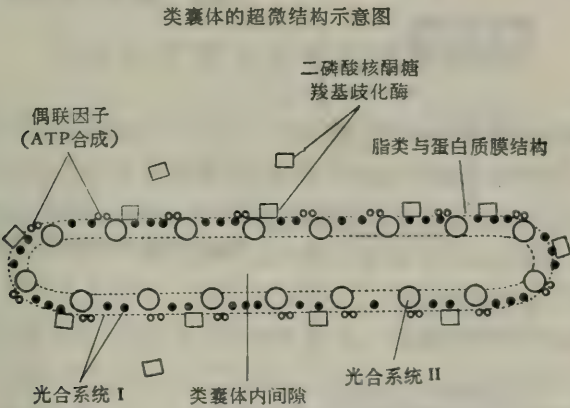
线粒体磷酸化和光合磷酸化之间的相似, 还可以通过另一条途径, 即对 ATP 酶活性的研究获得证明。正常的叶绿体不表现 ATP 酶活性, 但经某些巯基化合物如二巯苏糖醇处理后, 就引起了一种赖光 ATP 酶出现活性。这与用 2,4-二硝基酚一类的解偶联剂可引起线粒体 ATP 酶活性的情况相似。Racker 及其同事从玉米的叶绿体中抽提和精制



出一种蛋白质成分,在胰蛋白酶作用下和有  $\text{Ca}^{2+}$  存在时,这种成分具有水解 ATP 的能力。叶绿体 ATP 酶表现的性质,很象氧化磷酸化时在 ATP 偶联合成中发挥作用的线粒体的  $\text{F}_1\text{ATP 酶}$ 。它的分子量也大致相同(380,000),含有五个不同的亚基。这种叶绿体 ATP 酶又称为  $\text{CF}_1$ ,能起一种偶联因子的作用,并能使  $\text{CF}_1$  耗竭的叶绿体恢复光合磷酸化作用。

用电子显微镜观察玉米叶绿体的片层膜,揭示了叶绿体 ATP 酶和线粒体 ATP 酶之间更多的相似。这些膜显示,有 9 毫微米大小的球形从类囊体膜的外表面突出;而在线粒体中,这样的球形则是从内膜的内表面突出。当  $\text{CF}_1\text{ATP 酶}$  从叶绿体抽提出来时,这些球形物即自后者丢失;在适当条件下,当使  $\text{CF}_1\text{ATP 酶}$  返回已耗损的膜内时,球形物又可恢复,并伴有光合磷酸化作用的恢复。

图 22-14 是一个类囊体的膜表面的电子显微镜照片,有人认为这些粒状体是酶的复合体,其中有  $\text{CF}_1\text{ATP 酶}$  分子。



菠菜叶绿体的类囊体盘的膜表面于冰冻破碎后的电子显微镜照片。采用这种技术时,先把样品冰冻,然后用刀刃破碎以产生断面,再用金属铸模成复制品。这是金属复制品的形象。

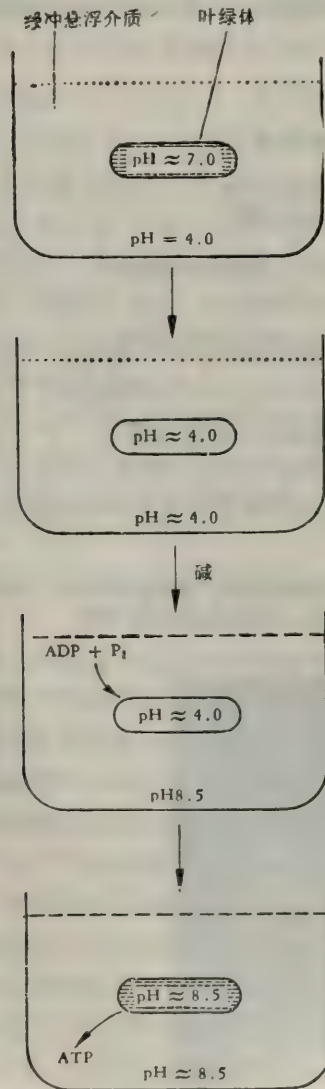


图 22-14 类囊体的超微结构

## 光合磷酸化作用的机制

关于氧化磷酸化作用的机制,我们已知有三种流行的假说,即化学偶联、构象偶联和化学渗透偶联假说。由于在线粒体的氧化磷酸化与叶绿体的光合磷酸化之间具有非常明显的相似性,因此有关线粒体磷酸化的这三种假说也可应用于光合磷酸化作用的机制上。

将化学渗透偶联假说作为光合磷酸化作用的基本机制,是和许多实验证据相符的。当叶绿体在显示循环电子流的情况下受到光照时,它们从悬浮介质中吸收  $H^+$ ,而使介质的碱性较前增强。当停止光照及光诱发的电子流中断时, $H^+$  又慢慢从叶绿体回到介质



使菠菜叶绿体长时间暴露于 pH 4.0 的酸浴中。

因此,叶绿体的内部 pH 接近于介质的 pH。

在黑暗中,将 ADP 和  $P_i$  与足量的碱一起加入,以使外部 pH 达到 8.5,因此就能在膜两侧建立暂时的 pH 梯度。

依靠 pH 梯度,在黑暗中从 ADP 和  $P_i$  生成了 ATP。

图 22-15 与光无关的 ADP 的磷酸化作用,它是依靠黑暗中在叶绿体内诱发的一个人为 pH 梯度完成的。



中。这些  $H^+$  移动与离体线粒体中电子传递时出现的情况非常相似,但有一点重要的差别。在线粒体内,电子传递时  $H^+$  被排入介质;而在叶绿体内,电子传递时  $H^+$  却被吸收。因此,叶绿体膜的两侧性 (Sidedness) 正好同线粒体膜的反相。

有利于化学渗透假说的另一个重要证据,是 Jagendorf 及其同事的发现。他们在叶绿体膜的两侧人为地强加一个 pH 梯度,就能在没有光能输入时促进 ADP 在黑暗中的磷酸化作用(图 22-15)。他们将叶绿体浸泡在由缓冲到 pH 4.0 的介质组成的酸浴中,就能使其内部的 pH 值人为地降低。然后在黑暗中将叶绿体与一种碱性缓冲液 (pH 8.5) 迅速混合,以便强使一个暂时的 pH 梯度越过膜;这种碱性缓冲液也含有磷酸和 ADP。混合后即有 ATP 的突然形成,同时 pH 梯度消失。

当采用单次激光脉冲 (20 毫微秒) 产生的极短光束的闪光照射叶绿体时,其电子载体只发生了一次“转换”。这时伴有叶绿体对  $H^+$  的吸收。Witt 及其同事在柏林曾利用这种生物物理的方法来确定电子流、 $H^+$  移动和 ATP 生成之间的定量关系。他们的观察结果也支持化学渗透假说。

## 植物的呼吸作用和光呼吸作用

绿色植物细胞除含有叶绿体外,还含有线粒体。而且已经肯定,这样的细胞依靠消耗早先在光照期通过光合作用所生成的底物,在暗中显示了线粒体呼吸与氧化磷酸化作用。问题是在光照下当光合作用活跃时,绿色植物细胞究竟是否也进行呼吸或是呼吸停止。从仔细测定被照射植物中氧和二氧化碳的交换率,特别是同位素氧的使用,已经发现,实际上植物在光照下进行光合作用时,也能进行呼吸。但是在被光照的绿色植物体内出现的那类呼吸,不是线粒体呼吸,因为它对于线粒体电子传递的特殊抑制剂并不敏感。绿色植物中这种“光照下”的呼吸作用称为“光呼吸”,它阻碍了光合作用。关于呼吸作用的机制,我们将在下章中考虑,因为它涉及己糖合成的中间产物,而这些产物又是在光合作用的暗反应期间生成的。

## 摘 要

除光合细菌利用  $H_2$ 、 $H_2S$  或某些有机化合物作为其电子供体外,所有光合型生物均能利用水作为电子供体,并从水中放出氧。虽然  $CO_2$  是高等植物的主要电子受体,但  $NO_3^-$ 、 $N_2$  和  $H^+$  也都可以作为电子受体。在光合作用中,光诱发性净电子流的方向总是朝向电负性更强的系统,即与标准氧还电位的正常梯度相反。吸收光提供了这种反向电子流动所需的能量。光合作用的第一阶段(光反应)是  $NADP^+$  的还原和 ADP 的磷酸化;在第二阶段(暗反应),则利用 NADPH 和 ATP 将  $CO_2$  还原成己糖。在真核细胞里,光合作用发生于类囊体,而后者是叶绿体中压扁的膜囊泡;它们聚叠起来组成称为基粒的结构。光合型细胞含有三类捕光色素,即叶绿素、类胡萝卜素和藻胆色素。它们排列成两组,称为光合系统 I 和光合系统 II。光合系统 I 含有叶绿素 a 和  $\beta$ -胡萝卜素以及单个 P700 分子。P700 是一种特殊化的叶绿素 a,起捕能器的作用。当光合系统 I 的一个色素分子受激发时,其能量水平被提高。于是,这种激发能被传递到 P700,从那里排出电子,以使

NADP<sup>+</sup> 还原成 NADPH。光合系统 II 具有它自己的一套色素和一个特异的反应中心,即 P 680(一种特殊化的叶绿素-蛋白质复合物)。光合系统 II 被波长较短的光所激活而起着放氧作用。不放氧的生物就缺少光合系统 II。在绿色植物中,光合系统 I 和 II 呈串联式连接。通过光合系统 I 的激发,将一个电子提升到高度还原的电位,再经由包括铁氧还蛋白与铁氧还蛋白-NADP 氧化还原酶在内的载体链,引起 NADP<sup>+</sup> 的还原。填充留在光合系统 I 的电子穴所需要的电子,是从受激发的光合系统 II 经过一个包括质体醌、细胞色素 b<sub>559</sub>、细胞色素 f 和质体蓝素在内的中央电子传递链而传来的。填充留在光合系统 II 的电子穴所需要的电子,则来自水,水又通过至今仍属未知的机制脱去氢和放出氧。

ADP 的磷酸化,与光合系统 I 和 II 之间的光诱发电子传递链偶联起来。非循环的光诱发电子传递,是发生在从 H<sub>2</sub>O 经过光合系统 I 和 II 再传到 NADP<sup>+</sup> 的电子净传递。每对电子从水流向 NADP<sup>+</sup> 时,至少产生 1 分子的 ATP。循环的光诱发电子流和磷酸化只在光合系统 I 内发生,这是通过一条没有电子受体的净还原的分路机制而实现的。在非循环电子传递中,为放出每分子氧和使 1 分子 CO<sub>2</sub> 还原,显然需要 8 个光量子,其中 4 个被光合系统 I 吸收,另 4 个被光合系统 II 吸收。此外,还必需 2 分子的 NADPH 和 3 分子的 ATP。

看来光合磷酸化作用具有许多与氧化磷酸化作用相同的性质;它能被特殊试剂解偶联或抑制。光合磷酸化作用的一种偶联因子已被分离出来;它具有 ATP 酶的活性。添加叶绿体 ATP 酶,可以使耗损的叶绿体恢复光合磷酸化作用。在光照下叶绿体吸收 H<sup>+</sup>。有相当多的证据提示,在光合型电子流与磷酸化时发生了化学渗透偶联。

## 参 考 文 献

### 书籍

- Clayton, R. K.: *Molecular Physics in Photosynthesis*, Blaisdell, New York, 1965.  
 Govindjee (ed.): *Bioenergetics of Photosynthesis*, Academic, New York, 1974.  
 Gregory, R. P. F.: *Biochemistry of Photosynthesis*, Wiley-Interscience, London, 1971.  
 Hall, D. O., and K. K. Rao: *Photosynthesis*, Arnold, London, 1972. A useful primer (67 pages).  
 Krogmann, D. W.: *The Biochemistry of Green Plants*, Prentice-Hall, Englewood Cliffs, N.J., 1973.  
 Rabinowitch, E., and Govindjee: *Photosynthesis*, Wiley, New York, 1969. A more comprehensive survey of photosynthesis.  
 Tribe, M., and P. Whittaker: *Chloroplasts and Mitochondria*, Arnold, London, 1972. Elementary review of chloroplast structure and function.  
 Vernon, L. P., and G. R. Seeley (eds): *The Chlorophylls*, Academic, New York, 1966.

### 论文

- Amesz, J.: "The Function of Plastoquinone in Photosynthetic Electron Transport," *Biochim. Biophys. Acta*, 301: 35—51 (1973).  
 Boardman, N. K.: "The Photochemical System of Photosynthesis," *Adv. Enzymol.* 30: 1—80 (1968). A review of earlier work.  
 Frenkel, A. W.: "Multiplicity of Electron Transport Reactions in Bacterial Photosynthesis," *Biol. Rev.*, 45: 569—616 (1970).  
 Hall, D. O., and M. C. W. Evans: "Photosynthetic Phosphorylation in Chloroplasts," *Sub-Cell. Biochem.*, 1: 197—206 (1972).  
 Hill, R.: "The Biochemists' Green Mansions: The Photosynthetic Electron Transport Chain in Plants," pp. 121—152 in P. N. Campbell and G. D. Greville (eds.), *Essays in Biochemistry*, vol. 1, Academic, New York, 1965. An interesting account written by a pioneer.  
 Ke, B.: "The Primary Electron Acceptor of Photosystem I," *Biochim. Biophys. Acta*, 301: 1—33 (1973).  
 Lemon, E., D. W. Stewart, and R. W. Shawcroft: "The Sun's Work in a Cornfield," *Science*, 174:



- 371—378 (1971). The energetics of photosynthesis in acultivated plant.
- Olson, J. M.: "The Evolution of Photosynthesis," *Science*, 168: 438—446 (1970).
- Reeves, S. G., and D. O. Hall: "The Stoichiometry (ATP/2e Ratio) of Non-Cyclic Photophosphorylation in Isolated Spinach Chloroplasts," *Biochim. Biophys. Acta*, 314: 66—78 (1973).
- Trebst, A.: "Energy Conservation in Photosynthetic Electron Transport of Chloroplasts," *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 25: 423—458 (1974).
- Witt, H. T.: "Coupling of Quanta, Electrons, Fields, Ions, and Phosphorylation in the Functional Membrane of Photosynthesis," *Q. Rev. Biophys.*, 4, 365—477 (1971).

## 习 题

1. 利用本书 529 和 530 页载明的数据,试计算一对电子从光合系统 II 的第一级电子受体传递到已去激发的 P700 时所伴发的标准自由能变化。
2. 假设习题 1 中描述的过程伴有 1 分子 ATP 生成,试计算该反步骤的能量储存效率。
3. 假设有一光合作用的量子需要数为 8,如所用光线的波长是: (a) 400 毫微米和(b)750 毫微米,试计算在标准状况下合成 1 克分子葡萄糖的热力学效率各是多少。

[谢慎思、刘俊凡译 卢义钦校]





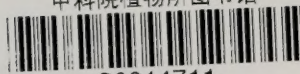
科学出版社

## 译 后 记

本书是当前公认的较好的教科书之一,作者在有限的篇幅中,比较全面地介绍了生物化学各方面的重要新成就,并能提出一些有趣的思想观点,而不局限于细节描述,且文字流畅,叙述生动。目前国外许多高等院校都采用它作为生化教材或主要参考书。

1974年科学出版社第二编辑室的同志来我院联系,研究这本书的翻译问题,大家一致认为很值得译出。在我院医教处和基础课部的组织领导下,由原生理生化教研组、科技情报室与遗传研究组的同志对此书第一版进行了翻译。由于参加工作的同志很多,专业不尽相同,因此,虽然在一年的时间内各部分译稿都已完成,但存在问题较多。1975年又由任邦哲、卢惠霖、唐恢玲等同志进行审校,经过他们艰苦细致的工作,终于有了全书的第一次译稿。这已经是1976年了。可是因为当时一些难于避免的干扰,又耽误了一年才将稿件送到出版社。不久该书第二版问世,全书重新写过,于是又根据新版重译。重译任务大部分仍由原译者承担,最后由任邦哲教授审校定稿。

这本书从开始翻译到出书经历了不少变化与波折,总校者任邦哲教授已经离开湖南医学院,调暨南大学医学院执教去了;曾参加这本书翻译的组织工作,也执笔翻译了一章的曹蕨子同志已经逝世。然而由于出版社和译校者的共同努力,这本书终于与读者见面了。虽然我们主观上想尽量译得好一些,但缺点和错误仍然难免,请读者批评指正。



S0014711

北京植物所

五 司 新

收到期 1982. 3. 29.

来源 西单新

书价 115.35

单据号 0061502

开票日期 82. 3. 27.



22852

58.173

490

生物化学.

细胞结构和功能的分子基础 上册

借者	还期	借者	还期
袁树	82.4.7		
罗丹	84.8.1		
	1984.7.7		
	1984.8.24		
	1984.8.24		

分 类 编 号
58.173
490
登记号 22852

## 读者注意

1. 爱护公共图书切勿任意卷折和涂写，损坏或遗失照章赔偿。
2. 请在借书期限前送还以便他人阅读请赐予合作。

成1106-1

统一书号: 1303·1702

定 价: 5.5 元

本社书号: 2326·3-10

科技新书目: 1030